

INDUCCIÓN DE CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS
MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA DIFERENCIADAS *IN VITRO*

DIANA MARCELA ROJAS GONZÁLEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2012

INDUCCIÓN DE CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS
MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA DIFERENCIADAS *IN VITRO*

DIANA MARCELA ROJAS GONZÁLEZ

Pasantía en Investigación para optar por el título de Ingeniera Biomédica

Directora
PAOLA ANDREA NEUTA ARCINIEGAS
MsC Ciencias Biomédicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2012

Nota de aceptación:

Aprobado por el comité de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Autónoma de Occidente para optar por el título de Ingeniera Biomédica

PAOLA ANDREA NEUTA ARCINIEGAS

Directora

Santiago de Cali, 10 de Enero de 2012

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
1. DEFINICION DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. MARCO REFERENCIAL	16
3.1 MARCO TEÓRICO	16
3.2 ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE	30
4. OBJETIVOS	35
4.1 OBJETIVO GENERAL	35
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5. METODOLOGÍA	36
5.1 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE	36
5.2 CULTIVO DE LAS CÉLULAS MADRE	36
5.3 DIFERENCIACION DE LAS MSC'S A CARDIOMIOCITOS	38
5.4 CARACTERIZACION DE LOS CARDIOMIOCITOS	38
6. INFORME DE LA INVESTIGACIÓN	40
6.1 EXTRACCION DE LOS HUESOS LARGOS DE RATA	40

6.2 OBTENCION DE LAS MSC'S	41
6.3 EXPANSIÓN <i>IN VITRO</i>	41
6.4 DIFERENCIACION	43
6.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS CARDIOMIOCITOS	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	52

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Expresión de marcadores de superficie en las MSC's	26
Tabla 2. Ejemplos de protocolos de cultivo para inducir diferenciación <i>in vitro</i> de MSC's	28

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Sarcómero	17
Figura 2. Proceso de diferenciación de una célula madre	22
Figura 3. Morfología de las MSC's	23
Figura 4. Multipotencialidad de las MSC's	25
Figura 5. 24 horas de Cultivo	42
Figura 6. 6 días de Cultivo	42
Figura 7. Confluencia alcanzada	42

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Protocolo para aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de médula ósea	52
Anexo B. Protocolo para la inducción y caracterización de cardiomiocitos a partir de células madre mesenquimales de médula ósea.	60

RESUMEN

La demostración de que las células madre mesenquimales (MSC's) tienen capacidades multipotenciales de producir células progenitoras de diferentes linajes celulares para la renovación de tejido, ha abierto amplias posibilidades para tratar enfermedades congénitas así como regenerar tejidos dañados. Una de estas enfermedades, quizás la más tratada hasta el momento, es la isquemia de miocardio. Muchos son los intentos que se han llevado a cabo para recuperar el tejido dañado del miocardio y devolverle su funcionalidad, entre ellos la terapia con células madre mesenquimales inyectadas de forma indiferenciada al corazón.

La ventana de tiempo pos-isquemia que transcurre antes de iniciar un tratamiento, es decisiva para el grado de beneficio que este tendrá en el corazón. Con el fin de reducir dicho tiempo, y teniendo en cuenta que la inyección de las células madre no garantiza una diferenciación hacia un linaje único, se plantea en este estudio la posibilidad de llevar a cabo dicha diferenciación *in vitro*.

Las MSC's se aíslan de médula ósea obtenida de huesos largos de ratas Wistar jóvenes (6-8 semanas de edad) usando un método de centrifugación y lisis de rojos. Las células se expanden en su forma indiferenciada durante 3 pases, y se caracterizan por inmunohistoquímica buscando presencia de moléculas como integrina $\beta 1$, CD54, colágeno tipo 1 y fibronectina. Posteriormente, la diferenciación se lleva a cabo en cultivo *in vitro* de las células bajo un medio especial, y para su identificación como cardiomiocitos, se hace uso de marcadores para actina, desmina, tropomiosina, troponina I, y ANP, las cuales son proteínas características de los cardiomiocitos.

PALABRAS CLAVE: Células madre mesenquimales, diferenciación celular, técnicas *in vitro*, cardiomiocitos, infarto agudo de miocardio, isquemia de miocardio, medicina regenerativa.

INTRODUCCIÓN

La isquemia de miocardio, se presenta cuando hay un desbalance entre el flujo sanguíneo que llega al miocardio, y la demanda metabólica de este¹. Cuando esta lesión se mantiene por un tiempo prolongado, puede causar un infarto cardiaco, que es la muerte o necrosis de los cardiomiocitos, lo cual produce un daño al miocardio que, hasta el momento es irreversible.

Las consecuencias de un infarto de miocardio pueden ir desde una disfunción ventricular, disminuyendo la calidad de vida de la persona, hasta la muerte de la misma. El infarto agudo de miocardio (AMI, según sus siglas en inglés), afecta a millones de personas cada año, constituyéndose como una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Para su tratamiento se han implementado diversas técnicas, siendo la reperfusión coronaria la más usada hasta el momento, pero ninguna de ellas contribuye a la reparación del tejido dañado, por lo que aún se investigan terapias o soluciones que lo permitan.

Hasta el momento, el miocardio se ha visto como un órgano sin potencial de regeneración, pero descubrimientos en cuanto a la multipotencialidad de las células madres, su capacidad de auto-regeneración manteniendo su característica indiferenciada, y las diversas fuentes a partir de las cuales pueden ser obtenidas desde una persona, han llevado a investigar todos los posibles usos de ellas en cuanto a la regeneración de tejidos dañados por algún tipo de enfermedad o trauma, incluyendo la isquemia de miocardio^{2,3}.

Las células madre de médula ósea, en especial las mesenquimales, han sido usadas por la gran mayoría de los estudios. Estas células presentan ventajas como fácil obtención, estabilidad y proliferación para cultivos *in vitro*, y modulación de la respuesta inmune. Dentro de las aplicaciones estudiadas, se encuentra el uso de dichas células, inyectadas en estado indiferenciado directamente en la

¹ BOOLOKI, Michael y ASKARI, Arman. Acute Myocardial Infarction [en línea]: Ohio, USA: Clínica Cleveland, 2010 [Consultado el 25 de agosto de 2010]. Disponible en Internet: <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/cardiology/acute-myocardial-infarction/>

² GEORGE, Jon. Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction: A review of clinical trials. *En: Translational Research: The journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Enero, 2010, vol. 155, no.1, p. 10.

³ POUNTOS, Ippokratis *et al.* Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *En: Injury: International journal for the care of the injured*. Septiembre, 2007, vol. 38, suplemento 4, p. S24-S25.

zona del miocardio afectada por la isquemia, obteniendo resultados favorables en cuanto a recuperación de la función ventricular y disminución del tejido afectado^{4,5,6,7}.

El desarrollo de un tratamiento con el cual se logre la regeneración del tejido cardiaco afectado por la isquemia, reviste de gran importancia en cuanto a la disminución de la tasa de mortalidad que dicha lesión trae, así como el impacto que esta solución tendría en cuanto al mejoramiento de la calidad de vida de las personas afectadas por esta. En el proyecto que se plantea a continuación se pretende determinar la posibilidad de inducir *in vitro* la diferenciación de células madre mesenquimales a cardiomiocitos, de forma que, a futuro, estas puedan inyectarse al tejido afectado e inicien en un tiempo menor el trabajo de regeneración del tejido, y así mismo de la funcionalidad ventricular.

⁴ ARMIÑAN, Ana *et al.* Mesenchymal Stem Cells provide Better Results than Hematopoietic Precursors for the Treatment of Myocardial Infarction. En: Journal of the American College of Cardiology. Mayo, 2010, vol. 5, no. 20, p. 2244.

⁵ NAKAMURA, Yasuhiro *et al.* Xenotransplantation of Long-Term-Cultured Swine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. En: Stem Cells. 2007, v.25, p.612.

⁶ MARTIN-RENDON E. *et al.* Stem Cell Treatment for Acute Myocardial Infarction (Review). The Cochrane Library. 3 ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2009. p. 1.

⁷ CHEN, Shao-Liang *et al.* Effect on Left Ventricular Function of Intracoronary Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Patients with Acute Myocardial Infarction. En: The American Journal of Cardiology. Julio, 2004, vol. 94, p. 92.

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El infarto de miocardio normalmente termina en la formación de un tejido fibroso en la pared del corazón, a pesar de la producción de sustancias cardioprotectoras por parte de las células circundantes⁸. Dado que los cardiomiocitos en el corazón adulto no se reproducen, la función cardíaca disminuye sustancialmente, afectando en especial la eficiencia ventricular^{9,10}.

Son muchas las alternativas que se han desarrollado para tratar de recuperar la capacidad contráctil del corazón, estas van desde tratamiento con medicamentos, hasta trasplante de corazón, siendo esta la solución última en casos de falla cardíaca crónica. La técnica más usada hasta el momento es la reperfusión cardíaca, esta se aplica en el menor tiempo posible después del infarto, y ha probado reducir la tasa de mortalidad temprana, pero inclusive con ésta opción se sigue teniendo una cantidad considerable de daño irreversible al tejido del miocardio, por lo que aún se siguen buscando estrategias para regenerar el corazón^{11,12}.

Haciendo uso de los avances en las técnicas de manipulación celular, en la actualidad está en investigación la implantación de células madre obtenidas de médula ósea directamente en el corazón infartado, encontrándose reportes de recuperación funcional dependiendo del tiempo post-isquemia en que las células son inyectadas, considerando que éstas primero deben diferenciarse *in vivo* a cardiomiocitos para poder dar inicio al efecto reparador¹³. Este requerimiento de las células de diferenciarse para poder ser funcionales en el órgano receptor, alarga el momento de inicio de la reparación, y en el caso del corazón, este tiempo es crítico pues de no iniciarse en el momento preciso, los efectos se ven disminuidos dramática e irreversiblemente.

⁸ ZAMMARETTI, Prisca and JACONI, Marisa. Cardiac tissue engineering: Regeneration of the wounded heart. En: Current Opinion in Biotechnology. Septiembre, 2004, vol. 14, p. 430.

⁹ JACKSON, Kathyjo y GOODELL, Margaret. Capítulo 23: Generation and Stem Cell repair of cardiac tissue. En: SELL, S. Stem Cells Handbook. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 260.

¹⁰ IVERNICI, Gloria *et al.* Human adult skeletal muscle stem cells differentiate into cardiomyocyte phenotype *in vitro*. En: Experimental Cell Research. Agosto, 2007, vol. 314, p. 367.

¹¹ BOOLOKI, Op. cit., Disponible en Internet: <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/cardiology/acute-myocardial-infarction/>

¹² DIMARAKIS, Ioannis *et al.* In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Parte 1: Culture medium and growth factors. En: Journal of cardio-thoracic –renal research. Junio, 2006, vol. 1, p. 108.

¹³ MARTIN-RENDON, Op. cit., p. 44.

Estudios con modelos de infarto de miocardio en roedores y aplicación de terapia con células madre no diferenciadas, han demostrado que dicha terapia tiene un mejor efecto entre menor sea el tiempo transcurrido entre el infarto y su aplicación¹⁴. Considerando que las células madre pueden ser cultivadas y tratadas *in vitro*, se propone trabajar su expansión en estado no diferenciado, y explorar la posibilidad de inducir las células madre hacia la diferenciación en cardiomiocitos, lo que a futuro abriría la posibilidad de inyectar células madre ya diferenciadas al corazón isquémico, para que inicien rápidamente el proceso de recuperación del tejido, y consecuentemente de la función cardíaca.

¹⁴ ZHANG, Yan *et al.* Timing of bone marrow cell therapy is more important than repeated injections after myocardial infarction. En: Journal of the Society for Cardiovascular Pathology. Julio, 2011, vol. 20, no. 4, p. 204.

2. JUSTIFICACIÓN

La frecuencia con que se presentan los eventos de isquemia cardiaca hace que sea considerada una de las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) más importantes, en la que se invierten recursos de manera abrumadora alrededor del mundo.

Durante el 2008, la isquemia cardiaca fue la tercera causa de mortalidad en Cali con 719 eventos, precedida por los homicidios (1.523 eventos), la enfermedad cerebro-vascular (984 eventos) y la hipertensión arterial (831 eventos), de acuerdo con las cifras del departamento de planeación municipal¹⁵. En el Valle del Cauca, en 2007, la tasa de isquemia cardiaca fue de 114,9 casos por cada 100.000 habitantes¹⁶, mientras que en Colombia, de acuerdo a estadísticas de la Organización Panamericana de la Salud en 2008, dichas enfermedades tienen una tasa de mortalidad del 17,67% en hombres a partir de los 30 años de edad, y del 17,16% en mujeres dentro del mismo rango de edad¹⁷.

El empeño en la búsqueda de alternativas terapéuticas que permitan restablecer la capacidad funcional del corazón no se explica solamente por las implicaciones de mortalidad, sino también por la morbilidad y el deterioro en la calidad de vida. La falla cardiaca conlleva mayor número de visitas al hospital por parte de la persona que la sufre, e inclusive, mayores admisiones a hospitalización o una duración más larga de la misma, lo cual trae además implicaciones financieras grandes¹⁸.

En condiciones ideales, una vez las células del miocardio sufren necrosis post-isquémica, los mecanismos reparadores deberían reemplazar las células perdidas por nuevos cardiomiocitos, y de esta forma mejorar la condición del corazón; pero esto no ocurre. Las células del músculo cardiaco dejan de reproducirse inmediatamente después de madurarse completamente lo que deja al corazón

¹⁵ Quince primeras causas de mortalidad en Santiago de Cali [en línea]. Cali, Colombia: Departamento administrativo de planeación municipal, 2008. [Consultado el 17 de mayo de 2010.] <http://planeacion.cali.gov.co/dapweb/index.asp>.

¹⁶ Estado de Salud del Valle del Cauca [en línea]. Cali, Colombia: Gobernación del Valle del Cauca, 2008. [Consultado el 17 de mayo de 2010]. Disponible en internet: <http://www.valledelcauca.gov.co/salud/publicaciones.php?id=60>

¹⁷ Causas Principales de Mortalidad en las Américas [en línea]. Colombia: Aplicación en línea del observatorio regional de la salud, PAHO (Organización Panamericana de la Salud), 2010. [Consultado el 8 de enero de 2012]. Disponible en internet: <http://ais.paho.org/phis/viz/mort-causasprincipales-It-oms.asp>

¹⁸ DIMARAKIS, Op. cit., p. 108.

adulto sin posibilidad de regeneración¹⁹; sin embargo, en nuestro organismo contamos con células madre, que pueden convertirse en cualquier otro tipo celular, bajo condiciones especiales^{20,21}.

La terapia con células madre, especialmente las células madre mesenquimales de médula ósea, ha surgido como una opción prometedora para el desarrollo de soluciones médicas en el área de la medicina regenerativa. Dichas células apoyan la hematopoyesis, tienen capacidad de controlar la respuesta inmune y presentan alta estabilidad para cultivos *in vitro*, lo que las hace muy atractivas para su uso en terapias celulares y regeneración de tejido²².

Es probable que una vez se inicie la formación del tejido cicatrizante después de varios días pos-isquemia, el miocardio sea menos receptivo a terapias disminuyendo el beneficio de estas²³. Dada la facilidad de manejo y la estabilidad de las células madre mesenquimales en cultivos *in vitro*, dicho tiempo puede hacerse menor si se induce la diferenciación antes de hacer la terapia en el corazón. Además, las células madre tienen tendencia a diferenciarse espontáneamente hacia diversos linajes cuando son trasplantadas *in vivo*, reduciéndose el número de cardiomiocitos para terapia activa en el corazón. Estas razones sugieren una mayor seguridad, efectividad y eficiencia en la repoblación celular, cuando se usan las células ya diferenciadas para terapia^{24,25,26,27}.

¹⁹ JACKSON, Op. cit., p. 260.

²⁰ GEORGE, Op. cit., p. 10.

²¹ LIU, Shu. Capítulo 9: Regeneration of Adult Cells, Tissues and Organs. En: Bioregenerative Engineering: Principles and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p. 386.

²² NASEF, A *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells. En: Libyan Journal of Medicine. 2007, vol. 2, no.4, p. 190.

²³ ZHANG, Op. cit., p. 2.

²⁴ DIMARAKIS, Op. cit., p. 108.

²⁵ IVERNICI, Op. cit., p. 367.

²⁶ DIMARAKIS, Ioannis *et al.* In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Parte 2: Chemicals, extracellular matrix, physical stimuli and coculture assays. En: Journal of Cardiothoracic-Renal Research. Julio, 2006, vol. 1, p. 115.

²⁷ LI, XiaoHong *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. En: Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2007, vol. 42, p. 296.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 MARCO TEÓRICO

El corazón es el primer órgano funcional en el embrión, su formación requiere una compleja interacción de diversos tipos celulares, entre ellos el mesodermo de la placa lateral y la cresta neural. Las células de la cresta neural contribuyen a la formación de arterias y ganglios cardíacos, mientras que el mesodermo de la placa lateral es inducido a diferenciarse en mesénquima cardíaca, la cual da origen a dos linajes cardiogénicos específicos: miocardio y endocardio²⁸.

El miocardio es un tejido contráctil y al mismo tiempo encargado de la conducción del impulso eléctrico para la contracción. Este tejido da origen a los precursores de los cardiomiocitos, quienes, al diferenciarse y madurar completamente en este tipo de células, dejan al corazón sin una fuente de células madre para apoyar la regeneración del tejido cardíaco^{29,30}. Sin embargo, algunos estudios han identificado en el corazón pequeñas poblaciones de miocitos en proceso de replicación, a los cuales se les atribuyeron propiedades de las CM. Se conocen también como células madre cardíacas, pero estas poblaciones aún se encuentran bajo estudio^{31,32}.

Los cardiomiocitos son unos de los diferentes tipos celulares que se encuentran en el corazón. Son células musculares polinucleadas de contracción involuntaria, que tienen una forma alargada y estriada. Estas células contienen sarcómeros, que son la unidad fundamental de la contracción, quienes a su vez se componen de filamentos de actina y miosina contenidos entre dos discos-Z. Estos filamentos se deslizan uno sobre otro generando contracción celular³³. Los filamentos delgados, compuestos principalmente de actina, están alineados en arreglos paralelos que se entrecruzan con los filamentos gruesos, compuestos de miosina. Los filamentos delgados se insertan en el disco o línea Z, mientras los de miosina usan la actina como el soporte estructural sobre el cual ejercen la fuerza tensora para la contracción (Figura 1)^{34,35}.

²⁸ JACKSON, Op. cit., p. 260.

²⁹ *Ibid.*, p. 260.

³⁰ GEORGE, Op. cit., p. 10.

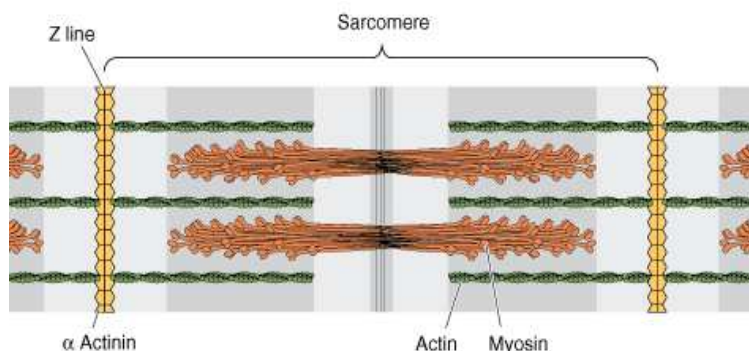
³¹ WONG, Cheuk-Kit *et al.* Beyond pharmacology in heart attacks: coronary stents and stem cells. *En: Heart and Metabolism*. 2007, vol. 36, p. 20.

³² BELTRAMI, Antonio *et al.* Adult Cardiac Stem Cells are multipotent and support myocardial regeneration. *En: Cell Press*. Septiembre, 2003, vol. 114, p. 764.

³³ LIU, Shu. Chapter 14: Cardiac Regenerative Engineering. *En: Bioregenerative Engineering: Principles and Applications*. New Jersey: Jhon Wiley & Sons, 2007. p. 585.

³⁴ *Ibid.*, p. 586.

Figura 1. Sarcómero



Fuente: APKON, M. Capítulo 9: Cellular Physiology of Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle. En: BORON, W y BOULPAEP, E. Medical Physiology. Edición actualizada. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p. 235.

Además de la actina, en un filamento delgado se encuentran también otras dos proteínas esenciales para el proceso de contracción y generación de la fuerza: tropomiosina, que se encarga de interferir en la unión entre la actina y la miosina, y troponina, que se compone de tres moléculas cada una con su propia función. La troponina-T se une a una molécula de tropomiosina, la troponina-C es afín al Ca^{2+} , y la troponina-I se une a la actina e inhibe la contracción. Cada heterotrímetro de troponina se relaciona con una sola molécula de tropomiosina, la cual a su vez interactúa con 7 filamentos de actina³⁶.

Una de las enfermedades más comunes del corazón es la isquemia. Esta ha sido definida como una anemia tisular (carencia de células rojas sanguíneas) debida a una obstrucción del flujo arterial coronario. La isquemia del miocardio es el resultado de un desbalance entre el aporte y la demanda de oxígeno en el miocardio, lo cual produce la muerte o necrosis de los miocitos cardíacos^{37,38}.

Para la necrosis completa de todos los cardiomiocitos en riesgo, se necesitan por lo menos de 4 a 6 horas. Un tiempo prolongado de isquemia es la causa del infarto agudo de miocardio o AMI (acute myocardial infarction), una enfermedad cardíaca

³⁵ CAPLAN, Michael. Capítulo 2: Functional Organization of the Cell. En: BORON, W y BOULPAEP, E. Medical Physiology. Edición actualizada. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p. 49.

³⁶ Ibid., p. 49.

³⁷ SCHACHINGER, Volker *et al.* Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. En: New England Journal of Medicine. Septiembre, 2006, vol. 355, p.1210.

³⁸ The Joint European Society of Cardiology and American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined: A consensus document. En: Journal of the American College of cardiology. 2000, vol. 36, no. 3, p. 960.

muy conocida por su alta mortalidad a nivel mundial^{39,40}. El AMI, en sus sobrevivientes, deja una marcada reducción de la función cardiaca debido a la pérdida de cardiomiocitos. El tejido infartado da paso a la formación de tejido fibrótico para cicatrizar, y los miocitos restantes sufren una hipertrofia en respuesta a la disminución de la cantidad celular y la no regeneración de este tipo de células. Esto último puede llevar a una insuficiencia cardiaca congestiva^{41,42}.

Dentro de las alternativas de tratamiento, se ha implementado el manejo convencional con medicamentos y, en algunos casos severos o en estadios terminales, se requieren intervenciones más agresivas como el trasplante cardiaco o el uso de dispositivos mecánicos asistenciales⁴³. Hasta el momento, el acercamiento que se ha considerado como óptimo para casi la totalidad de los casos de AMI e isquemia en general, es proceder lo más rápido posible a la revascularización directa del flujo coronario. Sin embargo, debido a que ni este ni otros tratamientos ofrecen hasta el momento una reparación del miocardio, ni un restablecimiento completo de la función cardiaca, se han explorado técnicas de la medicina regenerativa donde se usan células madre para tratar de reparar el daño al miocardio⁴⁴.

Las células madre (CM) son células clonogénicas indiferenciadas, que se caracterizan por su capacidad de auto-renovarse y de diferenciarse a un tipo específico de células. Estas características hacen posible la generación y regeneración de células, tejidos, y órganos en el ser humano, ya que este tipo de células actúan como un sistema de reparación interno^{45,46,47,48,49}.

³⁹ LI, Op. cit., p. 295.

⁴⁰ The Joint European Society of Cardiology and American College of Cardiology Committee, Op. cit., p. 966.

⁴¹ ZAMMARETTI, Op. cit., p. 430.

⁴² LI, Op. cit., p. 295.

⁴³ REINLIB, L. y ABRAHAM, W. Recovery from heart failure with circulatory assist: A working group of the national, heart, lung, and blood institute. En: Journal of Cardiovascular Failure. 2003, vol. 9, p.459.

⁴⁴ WONG, Op. cit., p 19.

⁴⁵ GEORGE, Op. cit., p. 10.

⁴⁶ LIU, Op. cit., p. 381.

⁴⁷ Stem Cells Primer [En línea]: USA: National Institute of Health, 2009 [Consultado el 20 de Mayo de 2011]. Disponible en internet: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>

⁴⁸ WEISSMAN, Irving. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. En: Cell. Enero, 2000, vol. 100, p. 157.

⁴⁹ CHAPMAN, Audrey; FRANKEL, Mark y GARFINKEL, Michele. Stem Cell Research and Applications: Monitoring the frontiers of Biomedical Research. Reporte producido por: The American Association for the Advancement of Science and the Institute for Civil Society. Washington, 1999. p. 1.

Las CM cuentan con cuatro propiedades o características fundamentales:

- Auto-Renovación: La CM hace copias de sí misma con el mismo potencial de diferenciación o similar. Aunque no ha sido comprobado que se puedan auto-renovar indefinidamente, estudios han demostrado que pueden durar un largo tiempo (de 4 a 5 veces el tiempo de vida en ratones)⁵⁰.
- Diferenciación: Es la capacidad de las CM de convertirse en uno de los tipos de células especializadas que forman los diferentes tejidos y órganos del cuerpo. La diferenciación es conducida por una red de factores de crecimiento y citoquinas, y no es posible que una vez diferenciada la CM se devuelva a su estado indiferenciado, es decir, es un proceso unilateral⁵¹.
- Migración: Ocurre en momentos específicos durante el desarrollo de la vida o bajo ciertas condiciones, generalmente es estimulada por factores que se liberan al darse daño en un tejido⁵².
- Apoptosis: Muerte celular programada. Es esencial para el mantenimiento normal de los tejidos. Puede ser estimulada por señales específicas, la no llegada de señales que evitan la apoptosis, y exposiciones a agentes infecciosos como los virus. En general, es un mecanismo para regular el número de células presentes en el cuerpo⁵³.

El balance entre estas actividades determina el número de CM que están presentes en el cuerpo, de hecho, el cáncer se da debido a una diferencia entre la tasa a la que las CM son producidas, y la tasa en la que estas se diferencian completamente o mueren⁵⁴. De acuerdo a su función, las CM pueden ser clasificadas en dos tipos:

- Comprometidas (*committed*): Se denominan también células progenitoras o precursoras. No tienen la capacidad de auto-renovación. Son aquellas que se diferencian en el tipo celular especializado del cual se compone el tejido donde se encuentra. Se localizan en cada uno de los sistemas, órganos y tejidos, y en estados avanzados del desarrollo del embrión, como por ejemplo en las capas dérmicas ya formadas (endodermo, mesodermo, y ectodermo)⁵⁵.
- No-comprometidas (*uncommitted*): Tienen la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tipos celulares existentes en el cuerpo humano, por tal razón también se conocen como células madre pluripotentes o embrionarias⁵⁶.

⁵⁰ DOMEN, Jos; WAGERS, Amy y WEISMANN, Irving. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. In: Cell. p. 19-20.

⁵¹ *Ibíd.*, p. 21.

⁵² *Ibíd.*, p. 21-22.

⁵³ *Ibíd.*, p. 22.

⁵⁴ SELL, Stewart. Stem Cells: *What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they going.* En: Stem Cells Handbook. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 1.

⁵⁵ LIU, Op. cit., p. 381.

⁵⁶ *Ibíd.*, p. 381.

Otra clasificación de las CM, se da de acuerdo a la capacidad de diferenciación que tienen. Las células primarias (desde el cigoto hasta la masa interna del blastocito o primeros ciclos de división celular), se denominan totipotenciales, y tienen la capacidad de diferenciarse en todo tipo de célula del organismo y formar órganos; después vienen las multi o pluripotenciales, quienes pueden diferenciarse también en cualquier tipo celular, pero no formar órganos; y por último están las progenitoras, que se diferencian en un solo tipo de célula^{57,58}.

Una característica del potencial de diferenciación de las CM se conoce como plasticidad. Hay tipos de CM que pueden ser más “plásticas” que otras, y que bajo condiciones adecuadas pueden cambiar de destino si es necesario, aunque estén ya diferenciadas. A este fenómeno se le conoce también como transdiferenciación⁵⁹. Existen diferentes tipos de CM, nombradas de acuerdo al tejido en donde se encuentren o la fuente de la que se obtengan. Las células madre embrionarias (ESC's, embryonic stem cells), como su nombre lo indica, se encuentran en, la masa celular interna del blastocito, células germinales, epiblasto, y en el embrión antes de la formación de las tres capas dermales⁶⁰. Existen también CM adultas, las cuales se encuentran en el sistema nervioso, epidermis, dermis, intestinos y médula ósea, siendo esta última la fuente de obtención más usada^{61,62}.

Las células madre adultas, se definen como células indiferenciadas que se encuentran entre células diferenciadas que conforman un tejido o un órgano, y que tienen como principal función la regeneración y reparación del tejido donde se encuentran⁶³. Dentro de las células madre adultas se encuentran las obtenidas de la médula ósea, las cuales han sido muy trabajadas en las investigaciones más recientes, ya que se ha comprobado su multipotencialidad, y no presentan dilemas éticos en su uso como las embrionarias. Entre las CM de médula ósea se tienen las células madre hematopoyéticas (HSC's por sus siglas en inglés), las estromales, y las células madre mesenquimales (MSC's por sus siglas en inglés), que generan principalmente hueso, cartílago, grasa, células de soporte, y tejido fibro-conectivo^{64,65}.

⁵⁷ SELL, Op. cit., p. 4.

⁵⁸ CHAPMAN, Op. cit., p. 1.

⁵⁹ DOMEN, Op. cit., p. 23.

⁶⁰ LIU, Op. cit., p. 381.

⁶¹ *Ibíd.*, p.385.

⁶² Stem cells primer, Op. cit., Disponible en internet: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>

⁶³ *Ibíd.*, Disponible en internet: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>

⁶⁴ LIU, Op. cit., p. 386.

⁶⁵ CHAPMAN, Op. cit., p. 1.

Las células en general se especializan en funciones determinadas, gracias a una secuencia de cambios paso a paso (Figura 2) de acuerdo a genes que se expresan dentro de ella. La diferenciación que ocurre con las células madre, es también una serie de etapas a través de las cuales la célula se va volviendo cada vez más diferenciada. Cada una de las fases de este proceso es irreversible⁶⁶. La diferenciación de las células madre se puede dar tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han realizado diversos tratamientos en los cuales las HSC's y MSC's se han extraído de cualquiera de sus fuentes, y se inyectan directamente a un tejido afectado por alguna enfermedad, y que necesite regeneración. Al hacer esta inyección, las CM quedan inmersas en un ambiente tal que las lleva a diferenciarse en el tipo de célula necesario^{67,68,69}.

La diferenciación celular es un proceso multifactorial con un gran arreglo de parámetros involucrados y diversas vías moleculares implicadas^{70,71}. Para lograr el proceso de diferenciación, se dan ciertas señales externas e internas que hasta el momento siguen siendo estudiadas. Las señales internas son controladas por los genes que se encuentran en la célula, y las externas incluyen químicos secretados por otras células, contacto físico con células vecinas, y moléculas presentes en el entorno de la célula. La adquisición de un fenotipo específico no recae únicamente en la interacción de genes, sino también en las interacciones entre los componentes de la matriz; comunicaciones constantes entre células, factores de crecimiento y estímulos físicos son algunos de los determinantes en este proceso⁷².

⁶⁶ Stem cells primer, Op. cit., Disponible en internet: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>

⁶⁷ NAKAMURA, Op. cit., p.

⁶⁸ LEE Oscar *et al.* Isolation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *En: Blood: Journal of the American Society of Hematology*. Marzo, 2004, vol. 103, no. 5, p. 1669 –1670.

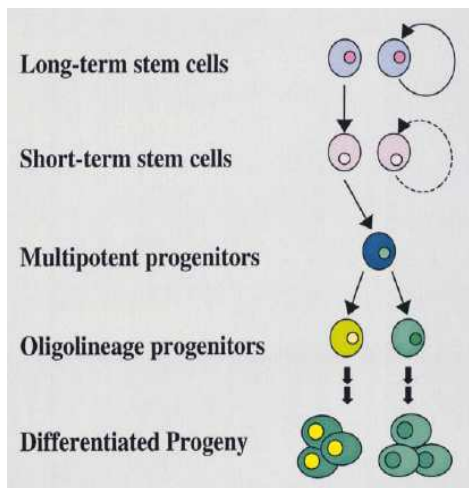
⁶⁹ SECCO, Marianne *et al.* Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord is Richer than Blood. *En: Journal of Stem Cells*. 2008, vol. 26, p.148.

⁷⁰ DIMARAKIS (Parte 1), Op. cit., p. 108.

⁷¹ DIMARAKIS (Parte 2), Op. cit., p. 116.

⁷² *Ibid.*, p. 118-119.

Figura 2. Proceso de diferenciación de una célula madre



Fuente: WEISSMAN, Irving. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. En: Cell. Enero, 2000, vol. 100, p. 158.

La médula ósea se caracteriza por ser la mejor fuente de CM tanto para experimentos como para aplicaciones clínicas, sin embargo el número de CM que en ella se puede encontrar, decae progresivamente con la edad de la persona. En la MO se han identificado cuatro tipos de CM hasta el momento: células madre hematopoyéticas (HSC's), células madre mesenquimales (MSC's), células *side population* (SP), y las células adultas progenitoras multipotenciales o MAPC⁷³.

Las MSC's son células multipotenciales no-hematopoyéticas, con la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tipos de células de los tejidos mesenquimales existentes como músculo, hueso, tendón, ligamento, tejido adiposo y fibroconectivo^{74,75,76}. Sus funciones principales son proveer factores de crecimiento y una matriz extracelular adecuada para apoyar la hematopoyesis de forma estructural y funcional, y contribuir a la regeneración de los tejidos mesenquimales del organismo, constituyendo estas las dos funciones principales de este tipo de células^{77,78,79}. Este tipo de células constituyen una población

⁷³ SERBAN, Ana Maria *et al.* Stem cell types in the bone marrow. En: Timisoara medical journal. Octubre, 2008, vol. 58, no. 3-4, p.244.

⁷⁴ *Ibíd.*, p. 246.

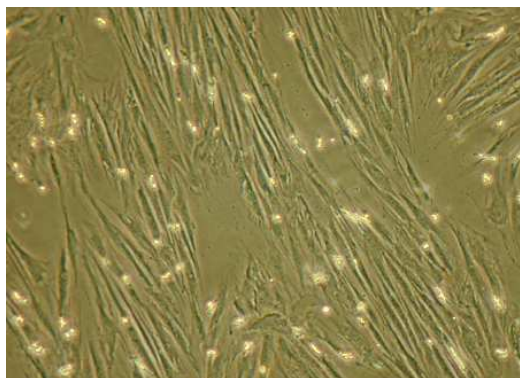
⁷⁵ DENNIS, James E. y CAPLAN, Arnold I. Capítulo 10 : Bone Marrow Mesenchymal Stem cells. En: SELL, S. Stem Cells Handbook. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 107.

⁷⁶ MINGUELL, José; ERICES, Alejandro y CONGET, Paulette. Mesenchymal stem cells (minireview). En: Experimental Biology and Medicine. 2001, vol. 226, no. 6, p. 507.

⁷⁷ NASEF, Op. cit., p. 191.

heterogénea de células adherentes y con morfología fibroblástica o de células alargadas (Figura 3), que en cultivo son capaces de auto-renovarse y diferenciarse, y que comandan la continua reposición del grupo células mesenquimales existentes en el organismo, ya sea en su estado normal de salud o bajo condiciones alteradas (lesiones, enfermedades, etc.)^{80,81}.

Figura 3. Morfología de las MSC's



Fuente: NASEF, A; FOUILLARD, L; EL-TAGURI, A and LOPEZ, M. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells. En: Libyan Journal of Medicine. 2007, vol. 2, no.4, p. 191.

Las MSC's son células no especializadas que pueden mantener su fenotipo indiferenciado, y bajo la influencia de señales biológicas específicas pueden diferenciarse a células especializadas con un fenotipo diferente al de la célula precursora⁸². En cultivo, las MSC permanecen inhibidas de contacto, y a medida que alcanzan la confluencia bajan la tasa de división hasta detenerla y permanecer quietas por largos periodos. Esta puede ser la razón por la que no son abundantes *in vivo*, y al mismo tiempo por la que son recomendables para terapias, ya que no proliferan demasiado como para formar tumores⁸³.

⁷⁸ KEMP, Kevin C.; HOWS, Jill y DONALDSON, Craig. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. En: Leukemia and Lymphoma. Noviembre, 2005, vol. 46, no. 11, p. 1531.

⁷⁹ BAKSH, D; SONG, L y TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. En: Journal of cellular and molecular medicine. Septiembre, 2004, vol. 8, no.3, p. 302.

⁸⁰ MINGUELL, Op. cit., p. 511.

⁸¹ WAGEY, Ravenska. Mesenchymal cells [En línea]: Canada: Stem Cells, 2008 [Consultado el 17 de Agosto de 2011]. Disponible en internet: <http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources/de276/29018Mesenchymalpdf.aspx>

⁸² NASEF, Op. cit., p. 190.

⁸³ PITTENGER, Mark. Capítulo 3: Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Therapy. En: Stem Cells and Myocardial Regeneration. New Jersey: Humana Press, 2007. p. 31.

A diferencia de las HSC's, las MSC's se encuentran en una baja tasa dentro de la MO. Ellas representan alrededor de 1/10.000 hasta 1/100.000 de todas las células mononucleares de este tejido, y su tasa disminuye entre mayor sea la edad del sujeto^{84,85}. Estudios realizados dan una cantidad aproximada de una MSC por cada 34000 células nucleadas en humanos, y de una por 11300 a 27000 células nucleadas en ratones⁸⁶. La entrada de estas células en la etapa de su vejez o inicio de la apoptosis es casi indetectable, ellas pierden sus características de células madre así como su capacidad de diferenciación a partir del sexto pase en cultivo^{87,88}.

La población de MSC's se denomina heterogénea, ya que comprende una mezcla de células con diferentes capacidades de diferenciación y proliferación, es decir, se encuentran células tanto del tipo comprometido como no-comprometido. En la MO se encuentran gran cantidad de MSC's no-comprometidas con capacidad de auto-renovación y multipotencialidad^{89,90}. Las MSC's normalmente son aisladas de aspiraciones o "cosechas" de MO obtenidas de la cresta iliaca posterior, y de los huesos largos como tibia y fémur⁹¹. Las MSC's también se han encontrado en otros tejidos o partes del cuerpo como el cerebro, timo, riñones, hígado, tejido adiposo, cordón umbilical, musculo y pulmones^{92,93,94}. La explicación a la presencia de MSC's en diferentes lugares aún no es clara, pero lo que sí se sabe con seguridad, es que esta distribución representa una reserva de células reparativas indiferenciadas en los tejidos, las cuales apoyan la regeneración tisular una vez sean activadas por las señales biológicas adecuadas (lesiones, inflamación y necrosis)⁹⁵.

A pesar que el nombre de MSC's se les dio por su capacidad de diferenciación a células de toda clase de tejidos mesenquimales, diferentes estudios han demostrado la multipotencialidad de estas células, y su capacidad de diferenciarse

⁸⁴ Ibid., p. 31.

⁸⁵ NASEF, Op. cit., p. 190.

⁸⁶ BEYER NARDI, N y DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, *in vitro* expansion and characterization. En: WOBUS, Anna y BOHELER, Keneth. Stem Cells. Vol. 174, Handbook of Experimental Pharmacology. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. p. 255.

⁸⁷ MINGUELL, Op. cit., p. 508.

⁸⁸ NASEF, Op. cit., p. 190.

⁸⁹ KEMP, Op. cit., p. 1534.

⁹⁰ BEYER, Op. cit., p. 252.

⁹¹ KEMP, Op. cit., p. 1531.

⁹² WAGEY, Op. cit., Disponible en internet: <http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources/de276/29018Mesenchymalpdf.aspx>

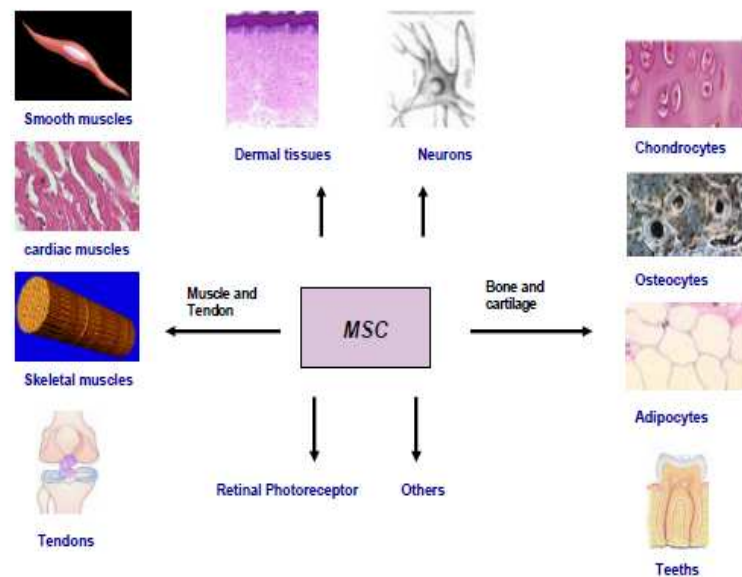
⁹³ BEYER, Op. cit., p. 255.

⁹⁴ BAKSH, Op. cit.,

⁹⁵ POUNTOS, Op. cit., p. S24.

a células de tejidos de otras capas dermales como músculo esquelético, cardiomiocitos, neuronales, renales, hepatocitos, epiteliales, pulmonares, pancreáticas, entre otras (Figura 4). Estas características permiten que sean consideradas como CM multipotenciales^{96,97,98}.

Figura 4. Multipotencialidad de las MSC's



Fuente: NASEF, A; FOUILLARD, L; EL-TAGURI, A and LOPEZ, M. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *En: Libyan Journal of Medicine*. 2007, vol. 2, no.4, p. 190-201.

Para las MSC's, al igual que para las CM en general, el proceso de diferenciación es unilateral y depende de señales o estímulos externos e internos. Las MSC's se pueden mantener indiferenciadas, pero bajo los microambientes apropiados logran la diferenciación al linaje deseado³⁵. Una vez diferenciadas, las MSC's pueden cambiar su fenotipo hacia otro linaje celular bajo el estímulo extracelular adecuado, exhibiendo plasticidad^{99,100,101}.

Las HSC's son fácilmente aisladas e identificadas gracias a que poseen marcadores de superficie específicos para ellas. En el caso de las MSC's, estas carecen de un marcador de superficie definido para su fenotipo, esto

⁹⁶ *Ibíd.*, p. S24.

⁹⁷ DOMEN, Op. cit., 23.

⁹⁸ PITTENGER, Op. cit., p. 31.

⁹⁹ KEMP, Op. cit., p. 1533.

¹⁰⁰ BAKSH, Op. cit., p. 309.

¹⁰¹ BEYER, Op. cit., p. 262-263.

principalmente a que comparten características con otros tipos de células como epiteliales, endoteliales y musculares, y que presentan un perfil variable de antígenos de superficie. En la tabla 1 se presenta una lista de marcadores positivos y negativos para las MSC's^{102, 103, 104}.

Tabla 1. Expresión de marcadores de superficie en las MSC's

Marcador	Expresión	Marcador	Expresión
CD4	-	CD9	+
CD10	+	CD11a	-
CD13	+	CD14	-
CD15	-	CD18	-
CD25	-	CD29	+
CD31	-	CD34	-
CD44	+	CD45	-
CD49a	+	CD49b	+
CD49c	+	CD49d	-
CD49e	+	CD50	-
CD51	+	CD54	+
CD58	+	CD61	+
CD62e	-	CD62L	+
CD62p	-	CD71	+
CD73 (SH3 y SH4)	+	CD90	+
CD102	+	CD104	+
CD105 (SH2)	+	CD106	+
CD117	-	CD119	+
CD120a	+	CD120b	+
CD121	+	CD123	+
CD124	+	CD126	+
CD127	+	CD140a	+
CD166	+	HLA class1	+
HLA-DR	-	LNGFR	+

Fuente: WAGEY, Ravenska. Mesenchymal cells [En línea]. Canada: Stem Cells, 2008 [Consultado el 17 de Agosto de 2011]. Disponible en internet: <http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources/de276/29018Mesenchymalpdf.aspx>

Debido a la falta de expresión de marcadores únicos en las MSC's, su aislamiento o extracción se hace aprovechando la característica de estas células de adherirse,

¹⁰² KEMP, Op. cit., p. 1532.

¹⁰³ POUNTOS, Op. cit., p. S24.

¹⁰⁴ WAGEY, Op. cit., Disponible en internet: <http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources/de276/29018Mesenchymalpdf.aspx>

proliferar y desarrollarse en una superficie estática^{105,106}. *In vitro*, su extracción también se basa en la adherencia al plástico, y gracias a su alta capacidad de proliferación, se pueden expandir ampliamente manteniendo su multipotencialidad¹⁰⁷.

Dentro del aspirado de MO, las MSC's se seleccionan por su adherencia, y son expandidas en un medio especial, generalmente compuesto por DMEM (Dulbecco's modified eagles médium) con baja concentración de glucosa, y un suplemento como FBS y L-glutamina, con condiciones de cultivo de 37 °C y 5% CO₂. Los cultivos contienen células que se auto-renuevan rápidamente y se mantienen en altas cantidades durante los pases, esto se puede ver incrementado si se mantiene su cultivo a una baja densidad (1×10^4 - $0,46 \times 10^6$). Los cultivos tienen una fase inicial lenta de 3 a 5 días, seguida de una rápida proliferación en la cual se puede alcanzar la primer duplicación entre las 12 y 24 horas. Hay muchas variaciones a la técnica de cultivo y los medios usados, dependiendo de la fuente de las células y la especie del donante. La diferenciación puede ser inducida *in vitro* por medio de la adición de los factores de crecimiento y medios adecuados de acuerdo al tejido deseado (Tabla 2)^{108,109}. Las técnicas tanto de cultivo como de diferenciación pueden variar ampliamente de acuerdo a la persona que las maneje.

Uno de los mayores obstáculos que enfrenta la terapia celular, al hacer trasplantes, es el rechazo inmunológico que puede presentar el receptor. Reportes de estudios con MSC's indican que estas células tienen propiedades inmunomodulatorias, y pueden inhibir las células presentadoras de antígenos, las *natural killer*, y la proliferación de linfocitos cito-tóxicos en las reacciones¹¹⁰. La enfermedad injerto contra huésped o GVHD (para sus siglas en inglés: Graft vs Host disease), es la complicación más común en los trasplantes de médula ósea. En esta, las células trasplantadas reconocen como extraño al receptor y montan un ataque inmune contra él. La fisiopatología de esta enfermedad incluye la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-12), y la activación de células dendríticas, macrófagos, *natural killer*, y células T cito-tóxicas¹¹¹.

¹⁰⁵ BAKSH, Op. cit., p. 302.

¹⁰⁶ DE CAMARGO, Renata Aparecida *et al.* Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. En: Acta Ortopédica Brasileira. 2006, vol. 14, no. 1, p. 22.

¹⁰⁷ BIANCHI DE DI RISIO, Catalina *et al.* Células mesenquimales de médula ósea: Diferenciación y potencial reemplazo neuronal. En: Medicina. Enero, 2004, vol. 64, no. 6, p. 545.

¹⁰⁸ NASEF, Op. cit., p. 191.

¹⁰⁹ KEMP, Op. cit., p. 1531.

¹¹⁰ NASEF, Op. cit., p. 193.

¹¹¹ KEMP, Op. cit., p. 1535.

Para la regulación inmunológica, las MSC's muestran un efecto supresor sobre las células T, el cual puede ser mediado por interacciones célula a célula, o indirectamente por factores solubles¹¹². Las MSC's interactúan con las células inmunes para alterar su producción de citoquinas, tanto así que DC-1 (pro-inflamatoria) disminuye la secreción de factor de necrosis tumoral, y la DC-2 (anti-inflamatoria) incrementa la secreción de IL-10 (inhibe respuesta inflamatoria de los linfocitos-T). Las MSC's hacen que las células pro-inflamatorias en el perfil Th1 disminuyan la secreción de IFN (interferon, proteína producida como respuesta a agentes externos), y que las anti-inflamatorias en el perfil Th2 incrementen la secreción de IL-4 (citoquina anti-inflamatoria)¹¹³.

Tabla 2. Ejemplos de protocolos de cultivo para inducir diferenciación *in vitro* de MSC's

Tejido	Especie	Complemento al medio de cultivo	Estudio fuente
Hueso	Ratón	10 ⁻⁸ dexametasona, 5µg/ml de ácido ascorbico 2-fosfato, y 10mM β -glicerofosfato.	Meirelles y Nardi, 2003
Cartilago	Humano	Factor de crecimiento transformante- β 3 en medio libre de suero, adicionado a cultivos tridimensionales.	Pittenger et al, 1999
Adiposo	Humano	1-metil-3-isobutilxantina, dexametasona, insulina e indometacina.	Pittenger et al, 1999
	Ratón	10 ⁻⁶ M dexametasona y 5µg/ml de insulina.	Meirelles y Nardi, 2003.
Neural	Humano	Isobutilmetilxantina y dibutiril cíclico AMP.	Deng et al, 2001
	Ratón	50 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), y 20 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF).	Anjos-Afonso et al, 2004
Musculo	Ratón	Amfotericina B.	Phinnery et al, 1999.
	Rata	5-azacitidina	Wakitani et al, 1995
	Cerdo	5-azacitidina	Moscoso et al, 2005

Fuente: BEYER NARDI, N y DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, *in vitro* expansion and characterization. En: WOBUS, Anna y BOHELER, Keneth. Stem Cells. Vol. 174, Handbook of Experimental Pharmacology. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. p. 263.

¹¹² KEMP, Op. cit., p. 1535.

¹¹³ PITTENGER, Op. cit., p. 32-33.

En los últimos años, y gracias al descubrimiento de las MSC's y su multipotencialidad, el uso de estas para terapia celular y de reparación y regeneración de tejidos se ha disparado. Los atributos que hacen a este tipo de células adecuadas para su aplicación en la medicina regenerativa son^{114,115}:

- Fácil aislamiento.
- Capacidad de alta expansión ex vivo.
- Producción de factores de crecimiento y citoquinas importantes.
- Estabilidad de fenotipo.
- Inhibición por contacto.
- Multipotencialidad.
- Propiedades inmunomodulatorias.

Las aplicaciones de las células madre han sido altamente estudiadas gracias a las posibilidades que trae su propiedad de diferenciación. La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa surgen como un nuevo campo multidisciplinario, debido en parte a los nuevos conocimientos sobre las CM. Ésta involucra la aplicación de los principios y métodos de la biología, medicina e ingeniería, para el desarrollo de métodos para restaurar, mantener o mejorar la función de tejidos y órganos^{116,117,118}.

En este campo emergente se tienen tanto aplicaciones diagnósticas (uso del tejido *in vitro* para pruebas de fármacos), como terapéuticas (crecimiento de tejido *in vivo* o *in vitro*, y trasplante)¹¹⁹. Dentro de las aplicaciones de MSC's para reparación de tejido, la más famosa es la de regeneración de hueso, en donde se han implantado células directamente en el daño, tanto solas como en una matriz artificial. Con los dos métodos se han logrado reparar defectos en huesos largos y en cráneo. Estas células también han sido usadas para la reparación de miocardio, donde las MSC's se han entregado por infusión directamente al sitio de infarto, diferenciándose a cardiomiocitos y mejorando la función global del corazón¹²⁰.

¹¹⁴ PITTENGER, Op. cit., p. 34.

¹¹⁵ KEMP, Op. cit., p. 1539-1540.

¹¹⁶ POLAK, Julia. Regenerative Medicine: A Primer for Pediatricians. En: Early Human Development. Noviembre, 2009, vol. 85, no.11, p. 685.

¹¹⁷ Medicina regenerativa II [en línea]: México: IMBIOMED, Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas, 2006 [Consultado el 25 de Junio de 2011]. Disponible en internet: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=37766&id_seccion=2547&id_ejemplar=3898&id_revista=66

¹¹⁸ NIH Definition of Tissue Engineering//Regenerative medicine [en línea]: Alemania: Tissue engineering pages, 2011 [Consultado el 25 de Junio de 2011]. Disponible en internet: <http://www.tissue-engineering.net/index.php?seite=whatiste>

¹¹⁹ Ibid., Disponible en internet: <http://www.tissue-engineering.net/index.php?seite=whatiste>

¹²⁰ KEMP, Op. cit., p. 1539.

Otras aplicaciones incluyen diferenciación en cartílago y tendón, pulmón, intestino, riñón, hígado y vaso, pero quizás una muy relevante es la generación de tejido neurológico, el cual puede ser usado para el tratamiento de lesiones causadas por derrames cerebrales, accidentes cerebro vasculares, o en enfermedades como el parkinson. Igualmente, se han usado técnicas de ingeniería de tejidos para modificación de genes en la MSC's, con lo cual se abre la posibilidad de hacer entrega de agentes quimioterapéuticos a células malignas en pacientes con cáncer^{121,122}.

3.2 ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

Debido a las dificultades para la obtención de células madre embrionarias y al dilema ético que estas conllevan, el uso de las células madre adultas ha sido el foco de las últimas investigaciones en el área, principalmente aquellas células obtenidas de la médula ósea. Como resultado de esto, se han hecho diversas aplicaciones de las HSC's y las MSC's al tratamiento de enfermedades como: enfermedades neurológicas degenerativas (ej: mal de parkinson), diabetes, lesiones de la córnea, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), lesiones de la médula espinal, y anomalías óseas (ej: osteogénesis imperfecta)^{123,124}.

El tratamiento celular con CM derivadas de la MO, se ha considerado como una nueva terapia para enfermedades cardíacas isquémicas. Sin embargo, se encuentran resultados contradictorios en este tema, los cuales radican desde ninguna mejora significativa en la función cardíaca, hasta un beneficio considerable a la contractilidad después del infarto de miocardio¹²⁵. El mayor ensayo clínico aleatorio multicéntrico realizado en humanos, utilizando células de médula ósea hecho hasta la fecha, es el REPAIRAMI, en él se trataron un total de 54 pacientes con infarto de miocardio y a quienes se les había realizado una intervención coronaria percutánea; a ellos se les asignó aleatoriamente un tratamiento con placebo o con terapia de células madre de médula ósea, y se hizo un seguimiento a un año por medio de imágenes de resonancia magnética. Los resultados obtenidos muestran una mejora en la fracción de eyección ventricular izquierda en los pacientes que recibieron infusión de células madre, igualmente la progresión del volumen final diastólico fue menor, y en comparación con los pacientes que recibieron placebo, esta no incrementó. En general, la infusión de

¹²¹ Ibíd., p. 1539.

¹²² BAKSH, Op. cit., p. 311-312.

¹²³ POLAK, Op. cit., p. 686.

¹²⁴ MEDICINA REGENERATIVA II, Op. cit., Disponible en internet:

http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=37766&id_seccion=2547&id_ejemplar=3898&id_revista=66

¹²⁵ ZHANG, Op. cit., p. 204.

células madre derivadas de médula, interfirió de manera beneficiosa con la remodelación adversa del miocardio que precede al infarto¹²⁶.

Otro estudio realizado con células de médula ósea para el tratamiento de infarto de miocardio, compara la habilidad de las células hematopoyéticas vs las células mesenquimales en un modelo de ligamento permanente en la arteria coronaria descendente izquierda en ratas. Las células se inyectaron de forma intramiocárdica, y la función cardíaca se analizó mediante ecocardiografía. Los resultados mostraron una función ventricular izquierda mejorada en ambos tratamientos, pero las células mesenquimales tuvieron un mejor desempeño en reducir el tamaño del infarto y prevenir la remodelación ventricular obteniendo una cicatrización menor en comparación con la obtenida con las células hematopoyéticas. Esto sugiere que las células madre mesenquimales pueden ser más efectivas en el tratamiento del infarto de miocardio, que el otro tipo celular dominante de la médula ósea¹²⁷.

Adicionalmente, se ha propuesto que el tiempo en el que se inicia la terapia de células madre post-infarto puede influir en si mejorará la función cardíaca después de inyectadas las células. El estudio de *Zhang et al*, en el que se inyectaron células de médula ósea en un modelo de infarto de miocardio en ratones, a espacios de tiempos diferentes, concluyó que la terapia celular tiene un mejor efecto si se aplica en una ventana de tiempo cercana al infarto (alrededor de 3 días), un tiempo mayor a este no trae beneficio alguno al corazón. Dentro del tiempo determinado se obtuvo una mejora en la función ventricular izquierda y un tamaño de infarto reducido, comparado con los controles (ratones a los que no se les aplicó terapia alguna)¹²⁸.

En la mayoría de los estudios, la diferenciación de las células madre a cardiomiocitos se hace *in vivo*, es decir, las células se inyectan indiferenciadas a la zona infartada y es ahí donde ellas llevan a cabo su proceso de diferenciación. Los estudios en los cuales dicha diferenciación se hace *in vitro*, no son abundantes ni manejan la misma técnica para lograr la inducción a cardiomiocitos, pero trabajan bajo la misma premisa de que el microambiente celular es quien determina el fenotipo en el cual maduran las células madre.

¹²⁶ DILL, Thorsten *et al*. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function (REPAIR-AMI). *En*: American Heart Journal. Marzo, 2009, vol. 157, p. 541.

¹²⁷ ARMIÑAN, Op. cit., p. 2244.

¹²⁸ ZHANG, Op. cit., p. 204.

Debido a los buenos resultados de los estudios *in vivo*, se podría llegar a pensar que el ambiente del corazón infartado es el que da las señales adecuadas para la obtención de cardiomiocitos, pero *Chen et al* en su estudio refuta esta hipótesis, al lograr la diferenciación de células madre a cardiomiocitos tanto en microambiente de corazón normal y de corazón infartado¹²⁹. Las MSC derivadas de médula ósea, han demostrado capacidad para fusionarse con cardiomiocitos neonatales en cultivos *in vitro* después de diferenciarse, ganando incluso la habilidad de hacer parte del ciclo celular. La diferenciación de MSC a cardiomiocitos ha probado ser más eficiente en co-cultivo con cardiomiocitos humanos en comparación con el tratamiento de las células con medio producido por cardiomiocitos en cultivo separado. Últimamente se ha reportado, en estudios con MSC de rata, que la diferenciación a cardiomiocitos usando la técnica de co-cultivo, resulta más exitosa cuando se usan cardiomiocitos neonatales que al usar adultos, lo cual sugiere una posible dependencia de edad de algunos inductores cardiacos¹³⁰.

Dentro de las técnicas *in vitro* de diferenciación se encuentra el cultivo de las células madre en un medio que contiene 5-azacitidina, el cual induce la diferenciación celular hacia el fenotipo cardíaco^{131,132}. También se encuentran técnicas como cultivar las células en suspensiones extraídas directamente de un corazón con AMI¹³³, co-cultivo con cardiomiocitos naturales, electroestimulación, o adición de factores de crecimiento al cultivo^{134,135,136}.

En el estudio realizado por *Dongxia et al* (2009) se investigó el potencial de diferenciación *in vitro* a cardiomiocitos de las CM extraídas de médula ósea de rata, cuando estas se cultivaban bajo condiciones similares a aquellas del infarto de miocardio. Las células madre fueron obtenidas de la médula ósea de huesos largos de rata usando la técnica de gradiente de Ficoll, y posteriormente cultivadas

¹²⁹ CHEN, You-Ren *et al.* The infarcted cardiac microenvironment cannot selectively promote embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes. *En: Cardiovascular Pathology*. 2011, vol. 20, no. 2, p. 77.

¹³⁰ DIMARAKIS (Parte 2), Op. cit., p. 117-118.

¹³¹ MOSCOSO, I *et al.* Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *En: Transplantation proceedings*. 2005, vol. 37, p. 481.

¹³² FUKUDA, Keiichi. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *En: Comptes Rendus Biologies*. Julio, 2002, vol. 325, no. 10, p. 1027.

¹³³ DONGXIA, Ge *et al.* Chemical and physical stimuli induce cardiomyocyte differentiation from stem cells. *En: Biochemical and biophysical research communications*. Febrero, 2009, vol. 381, p. 317.

¹³⁴ LI, Op. cit., p. 295.

¹³⁵ WANG, Tingzhong *et al.* Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *En: International journal of cardiology*. Enero, 2006, vol.109, p.74.

¹³⁶ MARTINEZ, Eliana y KOFIDIS, Theo. Adult Stem cells for cardiac tissue engineering. *In: Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011, vol. 50, no. 2, p. 313.

con DMEM + 10% de FBS. Para el proceso de inducción se trabajaron tres cultivos diferentes: uno de las células en una suspensión extraída directamente de un corazón de rata infartado para simular los estímulos bioquímicos, otro de las células en su medio de cultivo normal pero aplicando una tensión para simular la contracción y relajación cardíaca (estímulo físico), y un último cultivo donde se combinaban las condiciones anteriores. En los resultados se encontró que tanto el extracto de miocardio infartado como la aplicación del estímulo físico por separado inducían la diferenciación a cardiomiocitos, pero se veía un mayor efecto diferenciador cuando se aplicaban simultáneamente los dos estímulos a las células. La diferenciación se comprobó haciendo tinción de α -actina y conexina 43 en los cultivos, dos moléculas características de los cardiomiocitos¹³⁷.

Invernici et al (2007) usaron células madre de músculo esquelético humano, e indujeron su diferenciación a cardiomiocitos usando PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas), y ácido retinoico. El cultivo *in vitro* con PDGF-BB no mostró expresión significativa de marcadores cardíacos en las células obtenidas, ni siquiera al aumentar la concentración de la sustancia; por otro lado, el ácido retinoico mostró una alta inducción de las células madre hacia el linaje cardiomiogénico, obteniendo una expresión cercana al 100% de marcadores cardíacos como ANP, troponina I y α -actina, y mostrando actividad contráctil después de 7 días de cultivo. Adicionalmente, los cardiomiocitos obtenidos, fueron puestos en co-cultivo con células cardíacas de ratón durante 10 días, mostrando también capacidad de integración con dichas células¹³⁸. PDGF-AB también ha sido usado como inductor de diferenciación hacia cardiomiocitos, este factor fue usado en células madre de médula ósea de rata cultivadas *in vitro*, las cuales se ingresaron junto con el PDGF-AB en un modelo de infarto *in vivo*, obteniéndose formación de islas independientes de cardiomiocitos¹³⁹.

De las diferentes técnicas de diferenciación aplicadas, una de las más usadas es el tratamiento de las MSC's con 5-azacitidina. *Moscoso et al* (2005) estudiaron el potencial inductivo de dicha sustancia hacia el linaje cardiomiogénico. En este estudio se usaron células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea de cerdos, las cuales se mantuvieron en cultivo con DMEM + 10% SFB y antibióticos durante 4 semanas, y posteriormente fueron tratadas con 10 μ mol/L de 5-azacitidina durante 24 horas para diferenciarlas a cardiomiocitos. Mediante citometría de flujo se caracterizaron como mesenquimales las células extraídas de la médula de los cerdos, y por inmunocitoquímica se hizo detección de α -actina, troponina T, desmina, y conexión-43. Los resultados arrojaron tinción positiva para

¹³⁷ DONGXIA, Op. cit., p. 319-320.

¹³⁸ IVERNICI, Op. cit., p. 366.

¹³⁹ DIMARAKIS (Parte 1), Op. cit., p.110.

los dos primeros marcadores, y un porcentaje de diferenciación que variaba entre el 30% y 50% para los cultivos realizados¹⁴⁰.

Las MSC pueden ser orientadas, bajo ciertas condiciones, hacia el linaje miogénico. Un estudio muy famoso es el de *Bittira et al* (2002), quienes también usaron 5-azacitidina para pre-programar las MSC de rata hacia una diferenciación a cardiomiocitos. Las células fueron inyectadas en un corazón de rata infartado antes de que se diferenciaran completamente, y se encontró que dichas células se diferenciaron a cardiomiocitos alrededor del tejido cicatrizado, mientras que células no tratadas previamente con la sustancia mencionada, no tuvieron ningún tipo de diferenciación¹⁴¹.

En Latinoamérica, Brasil es el líder en la investigación con células madre. Hasta el momento han logrado tratamientos exitosos en regeneración de córnea, músculo defectuoso, diabetes tipo 1 y desobstrucción de arterias del corazón; todo con tratamientos usando células madre adultas de diferentes tejidos como el adiposo y la médula ósea, o de lugares como los ojos y la pulpa de los dientes¹⁴². A nivel nacional no se encuentran estudios publicados relacionados con la diferenciación de células mesenquimales en cardiomiocitos, o el uso de estas células en tratamiento de enfermedades cardíacas.

¹⁴⁰ MOSCOSO, Op. cit., p. 481.

¹⁴¹ BITTIRA, B *et al*. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myoacardial regeneration. *En: Thoracic Surgery*. 2002, vol. 74, p. 1154.

¹⁴² Células madre: La clave de la regeneración [Programa televisivo]. USA: Discovery Channel. 12, Febrero, 2011.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Inducir la formación de cardiomiocitos a partir de células Mesenquimales de médula ósea diferenciadas *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica para el aislamiento y cultivo de células madre Mesenquimales de médula ósea de huesos largos de rata.
- Caracterizar las células Mesenquimales obtenidas de médula ósea.
- Inducir la diferenciación de las células Mesenquimales en cardiomiocitos a través del cultivo *in vitro*.
- Verificar la diferenciación de las células Mesenquimales a cardiomiocitos.

5. METODOLOGÍA

5.1 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE

El proceso de extracción se inició con el sacrificio de la rata, el cual se hizo mediante una sobredosis de Isoflurano. Una vez sacrificada, las extremidades posteriores se separaron del tronco; la piel se removió previo a los cortes¹⁴³. Posteriormente los huesos largos se separaron cortando a través de la articulación de rodilla y tobillo. Se removió músculo y tejido conectivo del hueso, y una vez limpios, los huesos se colocaron en un tubo para centrifuga de 15 ml que contenía 7 ml de medio de transporte (HBSS + 10% Peptona + 0.1% Penicilina/Estreptomicina).

Para recolectar la médula ósea, se hizo un barrido de los huesos con HBSS. Para esto se cortaron los extremos de la tibia y el fémur justo por debajo de la cavidad medular, usando una segueta quirúrgica, y posteriormente se insertó una aguja unida a una jeringa de 10 cc llena de HBSS por uno de los extremos descubierto. El contenido de la aguja se vació en el hueso, drenando así la médula ósea, la cual se colectó en un tubo para centrifuga de 50ml, y después se pasó por un filtro de 70 μ m para remover restos de huesos o grupos de células.

Posteriormente, se adicionaron 10 ml de solución de lisis de glóbulos rojos (155mM NH_4CL + 5,7 mM K_2HPO_4 + 0,1 mM EDTA a pH 7,3), y se incubó por 5 minutos. Se centrifugó por 5 minutos adicionales a 2000 rpm y, al terminar la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el pellet se llevó a análisis con azul de tripan, para determinar el porcentaje de viabilidad celular y el rendimiento del proceso de obtención celular

5.2 CULTIVO DE LAS CÉLULAS MADRE

Las células obtenidas de la fase anterior, se sembraron en una o más botellas para cultivos celulares T-25 ó T-75 a 37 °C a 5% de CO_2 , las cuales contenían Knockout-DMEM. La elección del tipo y número de botellas de cultivo estuvo sujeta al número de células que se obtuvieron en la extracción, teniendo en cuenta que se deben tener entre 5000 y 25000 células por cm^2 .

¹⁴³ SOLEIMANI, M y NADRI, S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. En: Nature Protocols. Enero, 2009, vol. 4, no. 1. p. 102-106.

Este primer cultivo se denomina pase 0 (P0). Pasadas 24 horas de sembradas las células, se hizo cambio de medio para retirar detritos celulares y células no adheridas. Posteriormente, el medio de cultivo se renovó cada 2 o 3 días *in-vitro*. Las células en cultivo se observaron constantemente para controlar el nivel de confluencia que se iba obteniendo.

Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células se desprendieron adicionando aproximadamente 2 ml de solución de tripsina/EDTA al 0.25% e incubando por 5 min a 37 °C. El efecto de tripsinación se neutralizó adicionando un volumen igual de medio completo (Kockout DMEM), y las células desprendidas se sometieron a un proceso de conteo celular con azul de tripán.

Las células obtenidas del P0 se cultivaron en dos o más botellas T-25 ó T-75, de acuerdo con el porcentaje celular obtenido en P0, con medio de crecimiento y bajo las mismas condiciones del pase anterior. Este nuevo cultivo se denominó pase 1 (P1). Al igual que en P0, se cambió el medio a las 24 horas de sembradas y después cada 2 o 3 días *in vitro* hasta lograr un 80% de confluencia. Cuando esto se logró, de nuevo se desprendieron las células y se cuantificaron.

En P1 se obtiene una gran cantidad de células en cultivo (aproximadamente 6×10^6), por lo que P2 inició sembrando las células en botellas T-75 con 2×10^6 células por botella aproximadamente. El procedimiento continuó igual que los dos anteriores, y una vez se obtuvo la confluencia deseada, se hizo un último pase (P3), en donde se esperaba tener un mayor número de mMSC's a comparación de los anteriores.

Al finalizar cada uno de los pases del cultivo de mMSC's, una parte de las células obtenidas debían ser almacenadas en condiciones especiales que garantizaran la conservación de sus propiedades sin ningún tipo de alteración en las mismas. Este proceso se denomina criopreservación.

Igualmente se hizo la caracterización de las células por inmunocitoquímica, en esta se buscaron marcadores tanto positivos como negativos, con los cuales se determinó si en realidad las células eran MSC's. Dentro de los marcadores positivos se tienen dos moléculas de superficie: integrina $\beta 1$ y CD54, junto con dos moléculas de la matriz extracelular que producen las células mesenquimales en cultivo: fibronectina y colágeno tipo 1. Los marcadores negativos están constituidos por CD45, presente en monocitos y macrófagos, y CD14, presente en

leucocitos¹⁴⁴. Dicha caracterización se hizo con el kit de caracterización de células madre mesenquimales de rata de Milipore™.

Los pasos que se siguieron para la criopreservación y la caracterización con el kit de Milipore™, se encuentran descritos en el *Protocolo para Aislamiento y Caracterización de Células Madre Mesenquimales de Rata* (Ver Anexo A).

5.3 DIFERENCIACIÓN DE LAS MSC'S A CARDIOMIOCITOS

Se tomaron las células obtenidas del pase 3 que se encontraban criopreservadas. Cuidadosamente las células se transfirieron a botellas T-25 o T-75, y se retiró el medio de suspensión en el que se encontraban. Seguidamente, se aplicó al cultivo 15 ml o 5 mL (según la botella), de medio de diferenciación a cardiomiocitos precalentado a 37°C. Para este trabajo el medio a usar es el Medio de Diferenciación a Cardiomiocitos de Milipore™.

El medio de diferenciación se cambió cada 2 o 3 días *in vitro*, siempre precalentándolo a 37°C. Esta rutina se siguió por 12 o 15 días, tiempo en el cual las células debían haber alcanzado la diferenciación.

Nota: El proceso de diferenciación se hizo para cultivos de células obtenidas de cada uno de los pases del numeral 3, con el fin de determinar con la caracterización posterior de cardiomiocitos, en cual momento del cultivo de mMSC's se lograba obtener una mejor diferenciación a cardiomiocitos.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS CARDIOMIOCITOS

La caracterización de los cardiomiocitos derivados de mMSC's, se hizo con el kit de caracterización de Cardiomiocitos de Milipore™. Este kit contiene anticuerpos validados que son específicos para cardiomiocitos, junto con inmunoglobulinas de control. Dentro de los anticuerpos se tienen aquellos para marcar Actina y Desmina, las cuales son proteínas críticas para la estructura de los cardiomiocitos; se tiene Tropomiosina y Troponina I, proteínas de función contráctil, y el péptido atrial natriurético o ANP, que ayuda en el control homeostático de los miocitos

¹⁴⁴ MILIPORE™. Staining Protocol (for 8-well chamber slides). In: Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Rat), Catalog No. SCR018. USA. 1 folleto.

cardiacos¹⁴⁵. El proceso para la caracterización se basa en las recomendaciones de uso del kit dadas por el proveedor, y se encuentra descrito en el *Protocolo para la Inducción y Caracterización de Cardiomiocitos a partir de Células Mesenquimales de Médula Ósea* (Ver Anexo B).

¹⁴⁵ MILIPORE™. Staining Protocol (for 8-well chamber slides). En: Cardiomyocyte Characterization Kit (Rat), Catalog No. SCR059. USA. 1 folleto.

6. INFORME DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 EXTRACCIÓN DE LOS HUESOS LARGOS DE RATA

Debido a que los procedimientos que se realizaron en el desarrollo de la investigación involucraban animales, el proyecto fue avalado por el comité de ética animal de la Universidad del Valle.

Para la obtención de las células madre mesenquimales, se utilizaron 20 ratas Wistar macho, entre 6 y 8 semanas de edad. Este rango se define teniendo en cuenta que entre más adultas las ratas, menos cantidad de células se podían extraer. El procesamiento se hizo en cabina de flujo laminar estéril, y todo el material utilizado cumplió también con condiciones de esterilidad para prevenir contaminación de las muestras.

Las ratas se procesaron una por día en el laboratorio de fisiología de la Universidad del Valle. El procesamiento iniciaba con el sacrificio de la rata. Para esto el animal era encerrado en una caja cerrada junto con una mota de algodón empapada de Isoflourane (Abbott). Se esperaba alrededor de 10 minutos hasta que el animal muriera, y se comprobaba la ausencia de respiración y frecuencia cardíaca. Toda la zona de las extremidades inferiores hasta las superiores era rasurada. Posteriormente el animal era limpiado con alcohol yodado y enjuagado en solución salina estéril.

El animal se llevaba a la cabina de flujo laminar, en donde se realizaba el procedimiento quirúrgico para extraer los huesos largos. Se inicia con una incisión alrededor del tobillo, y con el bisturí, se retiró toda la piel alrededor de las extremidades inferiores. Dichas extremidades eran separadas del cuerpo cortando a través de la articulación de cadera, y la pata se separaba cortando la articulación de tobillo. Finalmente se retiraba el músculo alrededor de los huesos largos y estos se separaban cortando en la rodilla.

Ya limpios los huesos, se almacenaban a 20 °C, en un tubo Falcon® de 50 mL lleno de solución de transporte, mientras se limpiaba la cabina y se esterilizaba el laboratorio con luz UV durante dos horas.

6.2 OBTENCIÓN DE LAS MSC'S

Terminada la esterilización, los huesos se llevaban de nuevo a la cabina de flujo laminar. Allí se colocaban en una caja Petri junto con la solución de transporte, y con ayuda de una sequeta quirúrgica se removían las cabezas de ambos extremos de los huesos.

Con una jeringa llena de HBSS, se hacía el lavado de médula en cada hueso, y este se recogía en un tubo para centrifuga de 50 mL. Se filtraba la suspensión hacia otro tubo usando un filtro de 70 μ m. Aquí se agregaba la solución para lisis de rojos y se dejaba incubar durante 5 min a 37°C, un tiempo mayor de lisis podía afectar dramáticamente el número de células extraídas.

Finalizada la lisis, el tubo se llevaba a centrifugar durante 5 min a 2000 RPM para separar la fracción celular. El sobrenadante se descartaba y el precipitado se resuspendía en 10 mL de medio de cultivo, previamente preparado. Para cada extracción normalmente se preparaban 40 mL de medio de la siguiente forma: 0,4mL de Piruvato sódico + 0,4mL de L-Glutamina + 19,6 mL de MSCGM (Lonza) + 19,6mL de Knock-Out DMEM (Milipore) suplementado con 0,1% de aminoácidos no esenciales.

De la resuspensión obtenida se extraían 0,1 mL para determinar al porcentaje de viabilidad celular con el que se iniciaba, usando azul de Tripán. En promedio se trabajaba con una viabilidad inicial de 120×10^6 células, de las cuales se llevaban a cultivo 16×10^6 divididas en dos botellas T-75, y el resto se criopreservaban.

De todas las ratas procesadas, se contaminaron cuatro muestras. Esta contaminación se detectaba 48 horas después de realizado el procesamiento de la rata.

6.3 EXPANSIÓN *IN VITRO*

El cultivo de las células se hacía en incubadora de 37°C con 5% CO₂. Pasadas 24 horas del cultivo inicial (Figura 5), se hacía un primer cambio de medio. El medio se descartaba de la botella, y con él se iban las células no-adherentes y también algunas células mesenquimales que no alcanzaron a adherirse a la superficie.

El medio se descartaba por el lado donde se encontraban las células, y se ingresaba medio nuevo por el lado contrario. Para las botellas T-75 se usaban 15mL de medio, y en las T-25 se usaban 5mL. Posterior al cambio inicial, los cambios de medio se hacían cada 2 o 3 días, dependiendo de la tasa metabólica que presentaran las células.

Durante el cultivo en P0, se tuvo un promedio inicial de 12 a 15 días para que se alcanzara la confluencia necesaria (Figura 7). La morfología de células mesenquimales se iba desarrollando después de los 3 días en cultivo. A medida que se avanzaba, se alcanzaba una mayor confluencia y se observaba la formación de pequeñas colonias de células de distintos tamaños (Figura 6). Estas colonias se iban expandiendo hasta llenar la superficie de la botella. Para que las células proliferaran, era necesario que estuvieran en contacto. Esto se verificó con la primera muestra cultivada, en la cual el número de células puestas en cultivo fue muy bajo, y la proliferación de las MSC's no se dio como se esperaba.

Figura 5. 24 horas de Cultivo

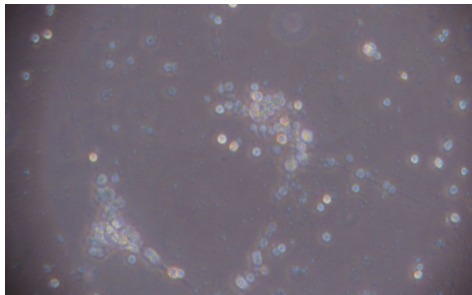


Figura 6. 6 días de cultivo

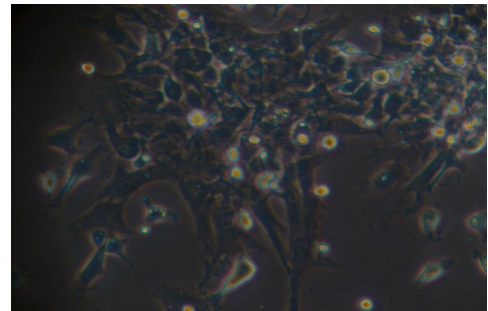
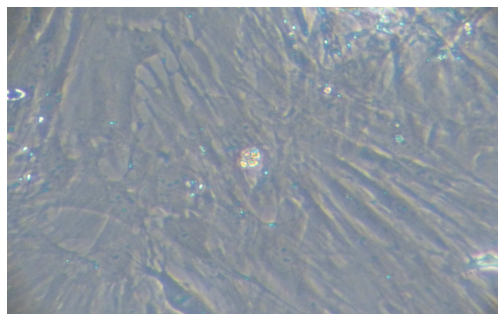


Figura 7. Confluencia alcanzada



Una vez alcanzada la confluencia, las células se desprendían de la superficie de la botella agregando 2mL de tripsina, después de descartado el medio. Se dejaba actuar por 5min, un tiempo mayor podía hacer daño a las células. Posteriormente se agregaba 2mL de medio con suero fetal bovino, el cual inhibe la acción de la

tripsina. La botella se balancea para barrer el mayor número de células posible, y la suspensión se transfiere a un tubo de 15mL.

Se centrifugó a 2000 RPM por 5 min, y el precipitado se resuspendió en 10mL de medio de cultivo. Se tomó una alícuota de 0,1mL para conteo celular. En promedio se obtuvo 7×10^6 células por botella, una viabilidad menor a la inicial ya que al aumentar de pase se tiene una población de células más específica, es decir, se tienen MSC's, además al aumentar de confluencia, las células aumentan de tamaño y ocupan mayor espacio, impidiendo que algunas se especifiquen.

De las células obtenidas, una parte se criopreserva y la otra se pone en cultivo (4×10^6 aproximadamente). Tanto en P1 como en P2 se tiene un promedio de 10 días para alcanzar confluencia. Cuando se alcanza la confluencia en P2, todas las células se llevan a congelar, y en ese momento se encuentran en P3. Si cultivan en P3, al momento de congelar las células estarían en P4 y se correría el riesgo de que inicien diferenciación espontánea hacia otros linajes celulares no deseados.

Una porción de las células obtenidas en cada pase se lleva a caracterización haciendo un *pool* de células, es decir, combinándolas todas para hacer una sola caracterización. En ellas se identifica la presencia de fibronectina, colágeno tipo 1, integrina $\beta 1$ y CD54 y la no presencia de CD14 y CD45. Todo este conjunto caracteriza como mesenquimales a las células extraídas.

6.4 DIFERENCIACIÓN

Células obtenidas de cada pase se toman para hacer un *pool* de células y poner en cultivo. Las muestras se cultivan simultáneamente en botellas T-75, procurando que la cantidad cultivada asegure un buen contacto entre ellas. Se agregan 15 mL de medio de diferenciación a cardiomiocitos (Milipore), y se dejan aproximadamente 15 días en cultivo. Al igual que en la expansión de MSC's, se hace cambio de medio cada 2 o 3 días.

Los cultivos se miran diariamente al microscopio para controlar la proliferación celular, y la diferenciación de las células hacia el linaje cardiomiogénico. Una vez pasado el tiempo de diferenciación, se desprenden las células y se criopreserva una parte, mientras la otra se lleva a caracterizar. El cultivo de las botellas se hace en incubadora de 37°C con 5% de CO₂.

6.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS CARDIOMIOCITOS

Las células obtenidas en diferenciación se llevan a caracterización usando el kit de caracterización de cardiomiocitos (Milipore). Dicho proceso se hace mediante inmunohistoquímica, y se busca la presencia de cinco moléculas características de los cardiomiocitos: actina, desmina, tropomiosina, troponina 1, y ANP o péptido atrial natriurético. La presencia de dichos elementos en el *pool* de células evaluado por microscopía confocal, confirman la obtención de cardiomiocitos a partir de las MSC's aisladas.

BIBLIOGRAFÍA

ARMIÑAN, Ana *et al.* Mesenchymal Stem Cells provide Better Results than Hematopoietic Precursors for the Treatment of Myocardial Infarction. En: Journal of the American College of Cardiology. Mayo, 2010, vol.5, no. 20, p. 2244-2253.

BAKSH, D; SONG, L and TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. En: Journal of cellular and molecular medicine. Septiembre, 2004, vol. 8, no.3, p. 301-316.

BELTRAMI, Antonio *et al.* Adult Cardiac Stem Cells are multipotent and support myocardial regeneration. En: Cell Press. Septiembre, 2003, vol. 114, p. 763-776.

BEYER NARDI, N y DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, *in vitro* expansion and characterization. En: WOBUS, Anna y BOHELER, Keneth. Stem Cells. Vol. 174, Handbook of Experimental Pharmacology. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. 409 p.

BIANCHI DE DI RISIO, Catalina *et al.* Células mesenquimales de médula ósea: Diferenciación y potencial reemplazo neuronal. En: Medicina. Enero de 2004, vol. 64, no. 6, p. 543-549.

BITTIRA, B *et al.* In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. En: Thoracic Surgery. 2002, vol. 74, p. 1154-1160.

BOOLOKI, Michael y ASKARI, Arman. Acute Myocardial Infarction [en línea]. Ohio, USA: Clínica Cleveland, 2010 [Consultado el 25 de agosto de 2010]. Disponible en Internet:
<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/cardiology/acute-myocardial-infarction/>

CAPLAN, Michael. Capítulo 2: Functional Organization of the Cell. En: BORON, Walter y BOULPAEP, Emile. Medical Physiology. Edición actualizada. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p.9-49.

CAUSAS PRINCIPALES de Mortalidad en las Américas [en línea]. Colombia: Aplicación en línea del observatorio regional de la salud, PAHO (Organización Panamericana de la Salud), 2010. [Consultado el 8 de enero de 2012] Disponible en internet: http://ais.paho.org/phis/viz/mort_causasprincipales_It_oms.asp

CÉLULAS MADRE: La clave de la regeneración [Programa televisivo]. USA: Discovery Channel. 12, Febrero, 2011.

CHAPMAN, Audrey; FRANKEL, Mark y GARFINKEL, Michele. Stem Cell Research and Applications: Monitoring the frontiers of Biomedical Research. Reporte producido por: The American Association for the Advancement of Science and the Institute for Civil Society. Washington, 1999. 51p.

CHEN, Shao-Liang *et al.* Effect on Left Ventricular Function of Intracoronary Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Patients with Acute Myocardial Infarction. En: The American Journal of Cardiology. Julio, 2004, vol. 94, p. 92-95.

CHEN, You-Ren *et al.* The infarcted cardiac microenvironment cannot selectively promote embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes. En: Cardiovascular Pathology. 2011, vol. 20, no. 2, p. 77-83.

DE CAMARGO, Renata Aparecida *et al.* Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. En: Acta Ortopédica Brasileira. 2006, vol. 14, no. 1, p. 22-24

DILL, Thorsten *et al.* Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function (REPAIR-AMI). En: American Heart Journal. Marzo, 2009, vol. 157, p. 541-547.

DIMARAKIS, Ioannis *et al.* In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Parte 1: Culture medium and growth factors. En: Journal of cardio-thoracic –renal research. Junio 2006, vol. 1, p.107-114.

DIMARAKIS, Ioannis *et al.* In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Part 2: Chemicals, extracellular matrix, physical stimuli and coculture assays. En: Journal of Cardiothoracic-Renal Research. Julio, 2006, vol. 1, p. 115-121.

DOMEN, Jos; WAGERS, Amy y WEISMANN, Irving. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. En: Cell. p.13-34.

DONGXIA, Ge *et al.* Chemical and physical stimuli induce cardiomyocyte differentiation from stem cells. En: Biochemical and biophysical research communications. Febrero, 2009, vol. 381, p. 317-321.

ESTADO DE Salud del Valle del Cauca [en línea]. Cali, Colombia: Gobernación del Valle del Cauca, 2008. [Consultado el 17 de mayo de 2010.] Disponible en internet: <http://www.valledelcauca.gov.co/salud/publicaciones.php?id=60>

FUKUDA, Keiichi. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. En: Comptes Rendus Biologies. Julio, 2002, vol. 325, no. 10, p. 1027-1038.

GEORGE, Jon. Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction: A review of clinical trials. En: Translational Research: The journal of Laboratory and Clinical Medicine. Enero, 2010, v.155, no.1, p.10-19.

IVERNICI, Gloria *et al.* Human adult skeletal muscle stem cells differentiate into cardiomyocyte phenotype *in vitro*. En: Experimental Cell Research. Agosto, 2007, vol. 314, p. 366-376.

JACKSON, Kathyjo y GOODELL, Margaret. Capítulo 23: Generation and Stem Cell repair of cardiac tissue. En: SELL, S. Stem Cells Handbook. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 259-266.

LEE Oscar *et al.* Isolation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. En: Blood: Journal of the American Society of Hematology. Marzo, 2004, vol. 103, no. 5, p. 1669 –1675.

LI, XiaoHong *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. En: Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2007, vol. 42, p. 295-303.

LIU, Shu. Capítulo 9: Regeneration of Adult Cells, Tissues and Organs. En: Bioregenerative Engineering: Principles and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p. 380-417.

LIU, Shu. Chapter 14: Cardiac Regenerative Engineering. En: Bioregenerative Engineering: Principles and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p. 585-658.

MARTIN-RENDON E. *et al.* Stem Cell Treatment for Acute Myocardial Infarction (Review). The Cochrane Library. 3 ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2009. 116 p.

MARTINEZ, Eliana y KOFIDIS, Theo. Adult Stem cells for cardiac tissue engineering. En: Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2011, vol. 50, no. 2, p. 312-319.

MEDICINA REGENERATIVA II [en línea]. México: IMBIOMED, Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas, 2006 [Consultado el 25 de Junio de 2011]. Disponible en internet: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=37766&id_seccion=2547&id_ejemplar=3898&id_revista=66

MILIPORE™. Staining Protocol (for 8-well chamber slides). En: Cardiomyocyte Characterization Kit (Rat), Catalog No. SCR059. USA. 1 folleto.

MILIPORE™. Staining Protocol (for 8-well chamber slides). En: Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Rat), Catalog No. SCR018. USA. 1 folleto.

MINGUELL, José; ERICES, Alejandro y CONGET, Paulette. Mesenchymal stem cells (minireview). En: Experimental Biology and Medicine. 2001, vol. 226, no. 6, p. 507-520.

MOSCOSO, I *et al.* Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. En: Transplantation proceedings. 2005, vol. 37, p. 481-482.

NAKAMURA, Yasuhiro *et al.* Xenotransplantation of Long-Term-Cultured Swine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. En: Stem Cells. 2007, v.25, p. 612-620.

NASEF, A *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells. En: Libyan Journal of Medicine. 2007, vol. 2, no.4, p. 190-201.

NIH DEFINITION of Tissue Engineering//Regenerative medicine [en línea]. Alemania: Tissue engineering pages, 2011 [Consultado el 25 de Junio de 2011]. Disponible en internet: <http://www.tissue-engineering.net/index.php?seite=whatiste>

PITTENGER, Mark. Capítulo 3: Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Therapy. En: Stem Cells and Myocardial Regeneration. New Jersey: Humana Press, 2007. p.29-43.

POLAK, Julia. Regenerative Medicine: A Primer for Pediatricians. En: Early Human Development. Noviembre, 2009, vol. 85, no.11, p. 685-689.

POUNTOS, Ippokratis *et al.* Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. En: Injury: International journal for the care of the injured. Septiembre, 2007, vol. 38, suplemento 4, p. S23-S33.

QUINCE PRIMERAS causas de mortalidad en Santiago de Cali [en línea]. Cali, Colombia: Departamento administrativo de planeación municipal, 2008. [Consultado el 17 de mayo de 2010.] <http://planeacion.cali.gov.co/dapweb/index.asp>.

REINLIB, L. y ABRAHAM, W. Recovery from heart failure with circulatory assist: a working group of the national, heart, lung, and blood institute. En: Journal of Cardiovascular Failure. 2003, vol. 9, p. 459-463.

SCHACHINGER, Volker *et al.* Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. En: New England Journal of Medicine. Septiembre, 2006, vol. 355, p. 1210-1221.

SECCO, Marianne *et al.* Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord is Richer than Blood. En: Journal of Stem Cells. 2008, vol. 26, p. 146-150.

SELL, Stewart. Stem Cells: *What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they going?*. En: Stem Cells Handbook. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 1-15.

SERBAN, Ana Maria *et al.* Stem cell types in the bone marrow. En: Timisoara medical journal. Octubre, 2008, vol. 58, no. 3-4, p. 244-248.

SOLEIMANI, M y NADRI, S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. En: Nature Protocols. Enero, 2009, vol. 4, no. 1. p. 102-106.

STEM CELLS Primer [en línea]. USA: National Institute of Health, 2009 [Consultado el 20 de Mayo de 2011]. Disponible en internet: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>

THE JOINT EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY y AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY COMMITTEE. Myocardial infarction redefined: A consensus document. En: Journal of the American College of cardiology. 2000, vol. 36, no.3, p.959-969.

WAGEY, Ravenska. Mesenchymal cells [en línea]. Canada: Stem Cells, 2008 [Consultado el 17 de Agosto de 2011]. Disponible en internet: <http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources/de276/29018Mesenchymalpdf.aspx>

WANG, Tingzhong *et al.* Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. En: International journal of cardiology. Enero, 2006, vol.109, p. 74-81.

WEISSMAN, Irving. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. En: Cell. Enero, 2000, vol. 100, p. 157-168.

WONG, Cheuk-Kit *et al.* Beyond pharmacology in heart attacks: coronary stents and stem cells. En: Heart and Metabolism. 2007, vol. 36, p. 19-23.

ZAMMARETTI, Prisca and JACONI, Marisa. Cardiac tissue engineering: Regeneration of the wounded heart. En: Current Opinion in Biotechnology. Septiembre, 2004, vol. 14, p.430-434.

ZHANG, Yan *et al.* Timing of bone marrow cell therapy is more important than repeated injections after myocardial infarction. En: Journal of the Society for Cardiovascular Pathology. Julio, 2011, vol. 20, no. 4, p. 204-212.

ANEXOS

Anexo A. Protocolo para aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de médula ósea de rata

Propósito:

Este documento describe el procedimiento para la obtención y proliferación de células madre mesenquimales de médula ósea de rata en cultivos *in vitro*, así como la caracterización de dichas células haciendo uso de técnicas de inmunocitoquímica.

Tabla de Contenido

- 1.0 Equipos Necesarios
- 2.0 Materiales Necesarios
- 3.0 Reactivos y Medios de cultivo
- 4.0 Soluciones de Trabajo
- 5.0 Procedimiento

1.0 Medidas De Seguridad

Nivel de Bioseguridad para el procedimiento es 2, se debe de seguir el procedimiento para el manejo de tejidos primarios. Mantener durante todo el proceso una buena técnica de aseptia.

2.0 Equipo Necesario

- 2.1 Cabina de flujo laminar
- 2.2 Centrifuga refrigerada
- 2.3 Incubadora mantenida a 37 °C, con 5% de CO₂ y atmósfera humidificada
- 2.4 Pipeteador automático
- 2.5 Cámara de Neubauer
- 2.6 Microscopio de contraste de fase
- 2.7 Pipetas automáticas P-10, P-100, P-1000
- 2.8 Micropipetas multicanal
- 2.9 Computador
- 2.10 Congelador a -80 °C
- 2.11 Tanques con nitrógeno líquido
- 2.12 Equipo de microscopía confocal

3.0 Materiales Necesarios

- 3.1 Botellas para cultivos celulares T-25 y T-75 "Falcon" o equivalentes
- 3.2 Cajas de petri de 35 mm "Falcon" o equivalentes
- 3.3 Tubos para centrifuga estéril de 15 ml y 50 ml "Falcon" o equivalentes
- 3.4 Pipetas estériles de 2, 5, 10 y 25 ml "Falcon" o equivalentes.
- 3.5 Botellas estériles de 125 ml "Nalgene" o equivalentes
- 3.6 Crioviales de 1.8 ml
- 3.7 Jeringas de 10 cc
- 3.8 Segueta quirúrgica
- 3.9 Equipo de disección: pinza con garra, pinza de punta lisa, tijeras rectas y curvas.
- 3.10 Hojas de bisturí
- 3.11 Láminas de cultivo de 8 pozos.
- 3.12 Cubreobjetos de vidrio.

4.0 Reactivos y Medios de Cultivo

- 4.1 Knockout Dulbecco medio modificado DMEM "Gibco BRL" o equivalentes
- 4.2 MSCGM-DCTM BulletKit "Lonza"
- 4.3 Suero fetal bovino (FBS) "Gibco BRL" o equivalentes
- 4.4 Solución salina balanceada de Hank's (HBBS) "Gibco BRL" o equivalentes
- 4.5 Buffer salino fosfato 1X (PBS 1X) pH 7.4 "Gibco BRL" o equivalentes
- 4.6 Dimetilsulfoxido (DMSO) "Sigma" o equivalentes
- 4.7 Colagenasa tipo 1
- 4.8 Trypsina 0.025
- 4.9 Ácido etilendiaminotetra acético disódico (EDTA) 0.5 M pH 7.3 en agua destilada y tamponado con NaOH 10 N. Esterilizado por filtración. "Sigma" o equivalentes.
- 4.10 Azul de tripam al 1% en PBS "Sigma" o equivalentes
- 4.11 L-Glutamina "Gibco BRL" o equivalentes
- 4.12 Piruvato sódico "Gibco BRL" o equivalentes
- 4.13 Aminoácidos no esenciales
- 4.14 Kit de caracterización de células madre mesenquimales "Milipore™"
- 4.15 Anticuerpos secundarios etiquetados con fluorescencia (IgG anti-ratón de burro e IgG anti-conejo de burro).
- 4.16 4'-6-Diamidino-2-Fenylindole (DAPI).
- 4.17 Anti-fading mounting solution "Milipore™"

5.0 Soluciones de Trabajo

- 5.1 *Reactivos para tripsinización:*
Trypsina/EDTA (SIGMA T-4799, E-6635) (0.025%) Mantener la solución a -20°C.

- 5.2 *Medio de Transporte:*
HBSS suplementado con GA-500, Peptona 10% (SIGMA P-5905) y 0,1% de Penicilina/Estreptomicina. Mantener la solución a 4 °C.
- 5.3 *Medio para Criopreservación:*
Medio de cultivo con 10% de DMSO (SIGMA D-2650) con 10% FBS
- 5.4 *Medio de Cultivo:*
10% de L-Glutamina + 10% de Piruvato de sodio + 30% de MSCGM Bulletkit + 30% de Knock-out DMEN suplementado con 0,1% de aminoácidos no esenciales.
- 5.5 *Solución para conteo celular:*
Azul tripan (SIGMA T-6146) al 0.4%
- 5.6 *Solución de Lisis de Rojos:*
155 mM NH_4Cl con 5.7 mM K_2HPO_4 con 0.1 mM EDTA a pH 7.3. Esterilizada por filtración. Mantener a 4 °C.
- 5.7 *Solución de Fijado:*
Paraformaldehído al 4% en PBS 1X.
- 5.8 *Solución de Bloqueo:*
PBS 1X complementado con suero de burro al 5% y 0.3% de Triton X-100. Filtrada a través de un filtro de 0.45µm.
- 5.9 *Solución de Bloqueo no permeable:*
PBS 1X con suero de burro al 5%. Filtrada a través de un filtro de 0.45µm.
- 5.10 *Solución para tinción DAPI:*
200ng/mL de DAPI disueltos en PBS 1X. Mantener la solución en condiciones de oscuridad.

6.0 Procedimiento

6.1 Sacrificio de la rata

- 6.1.1 Tome la rata y con una hoja de bisturí, retire el pelaje que cubre las extremidades inferiores. Rasure desde la altura media del vientre hasta la cola.
- 6.1.2 Moje una mota de algodón con alta cantidad de isoflurano.
- 6.1.3 Introduzca la rata en un espacio cerrado (caja), con el algodón cercano a su nariz para garantizar la inhalación del agente anestésico. Espere hasta que la rata este completamente inconsciente.

- 6.1.4 Saque el animal y deje por un momento más el algodón pegado a su hocico hasta que este muera. Verifique el cese de la respiración y la ausencia de signos vitales.
- 6.1.5 Limpie las extremidades inferiores con alcohol yodado y enjuague con solución salina estéril.
- 6.1.6 Lleve la rata hacia la cabina de flujo laminar estéril para iniciar el proceso quirúrgico.

Nota: Usar ratas con 6 a 8 semanas de edad.

6.2 Extracción de los huesos largos

- 6.2.1 Haga una pequeña incisión a la altura de la articulación del tobillo e inicie la remoción de la piel alrededor de las extremidades inferiores ayudado del equipo de disección previamente esterilizado.
- 6.2.2 Retire totalmente el músculo alrededor de los huesos, y con las tijeras separe los huesos cortando las articulaciones que unen el fémur a la cadera, la tibia al fémur y la tibia a la pata de la rata.
- 6.2.3 Remueva los residuos de músculo pegados a los huesos.
- 6.2.4 Lave los huesos en una caja de petri de 35mm con PBS.
- 6.2.5 Almacene los huesos en un tubo para centrifuga de 50ml lleno con solución de transporte.

6.3 Obtención de la médula ósea

- 6.3.1 Retire los huesos de la solución de transporte.
- 6.3.2 Con la segueta quirúrgica haga una guía en los extremos de los huesos por encima de la cavidad medular.
- 6.3.3 Parta las cabezas de los huesos haciendo fuerza con ayuda de una pinza.
- 6.3.4 Llene una jeringa de 10cc con HBSS. Inserte la aguja de calibre 27 por la cavidad medular expuesta de los huesos, vacíe el contenido de la jeringa.
- 6.3.5 Recoja el vaciado de los huesos en un tubo para centrifuga de 50ml.

6.4 Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales

- 6.4.1 Filtre la suspensión de médula ósea en un tubo para centrifuga de 50ml usando un filtro de 70µm.
- 6.4.2 Adicione 10ml de solución de lisis de rojos a la suspensión e incube por 5 minutos a 37°C. Terminada la incubación centrifugue por 5 minutos adicionales a 2500 rpm.
- 6.4.3 Resuspenda el pellet en un tubo para centrifuga de 15ml adicionando medio de cultivo hasta completar 10ml de suspensión.
- 6.4.4 En un vial, realice una dilución 1:10 adicionando 0,1mL de la suspensión de células en el medio de cultivo a 0,9mL de azul de

solución para conteo celular. Retorne el resto de células a la incubadora hasta la lectura para la congelación.

6.4.5 Remueva 10 μ l de la suspensión anterior y lleve a cámara de Neubauer. Lleve al microscopio y ejecute el conteo de células y la estimación de la viabilidad. Las células deberán observarse como esferas y aparecen completamente sueltas.

6.4.6 Calcule el número total de células obtenidas (i.e. promedio de células contadas x factor de dilución (1:10) x 10000 x volumen de medio (10)). Promedie el resultado de los conteos de las dos partes de la cámara.

6.4.7 De acuerdo al volumen de células obtenidas en el conteo, distribuya la suspensión de células del numeral 6.4.3 en una o más botellas de cultivo T-25 o T-75 según su criterio. Tenga en cuenta que para que haya una buena proliferación celular debe haber buen contacto celular.

6.4.8 Agregue 14ml de medio de cultivo a la botella T-75 o 5ml si es T-25, y lleve a la incubadora de 37°C.

6.5 Criopreservación

6.5.1 Prepare el medio para criopreservación y marque los crioviales.

6.5.2 El día de la criopreservación, lave la monocapa celular con PBS dos veces x 5 minutos, adicione a cada botella de cultivo aproximadamente 2 mL de la solución de tripsina/EDTA al 0.25%, incube por 5 minutos a 37°C.

6.5.3 Al terminar el tiempo de incubación observe las botellas al microscopio para verificar el desprendimiento de las células, con una pipeta serológica de 5 mL agite las células suavemente, adicione 5 mL de medio de cultivo y transfiera las células junto con el medio a un tubo cónico de centrifuga de 15 mL. Centrifugue a baja velocidad 900 rpm por 5 minutos,

6.5.4 Resuspenda el pellet de células en 2 mL de medio de cultivo. Mezcle suavemente, y posteriormente complete hasta 10mL de medio de cultivo.

6.5.5 Remueva una alícuota de 0.1 mL en dos nuevos tubos de 15 mL que contengan 0.9 mL de Azul de Tripam al 0.4%. Retorne el resto de células a la incubadora hasta la lectura para la congelación.

6.5.6 Cuando termine la centrifugación aspire cuidadosamente el medio y resuspenda el pellet

6.5.7 Remueva 10 μ l de la suspensión del punto 6.5.6 y ejecute el conteo de células y la estimación de la viabilidad.

6.5.8 Las células deberán observarse como esferas y aparecen completamente sueltas.

6.5.9 Cuente las células. Calcule el número total de células para congelación (i.e. promedio de células contadas x factor de dilución

(1:10) x 10000 x volumen de medio (10)). Promedie el resultado de las dos alicuotas. Resuspenda las células en un volumen apropiado de medio de criopreservación, que de una concentración final de 2.8 millones de células por ml.

6.5.10 Alicuote las células en los crioviales marcados; dispense 1 mL. por vial con pipeta de 5 ml Poner especial atención de mezclar la suspensión de células durante la alicuota.

6.5.11 Criopreserve todos los viales por 24 horas a -70°C y posteriormente transfiera los viales a Nitrógeno líquido -196°C .

6.5.12 Lleve los frascos a una incubadora a 37°C con 5% de CO_2 .

6.6 Posterior al Cultivo Primario

6.6.1 El primer cambio de medio es requerido 24 horas después. Retire el medio de las botellas de cultivo vaciándolo cuidadosamente por el lado donde se encuentran las células.

6.6.2 Agregue 14ml de medio de cultivo nuevo (o 5ml si es una botella T-25) con una pipeta por el lado contrario a donde se encuentran prendidas las células.

6.6.3 Lleve a incubadora de 37°C .

6.6.4 Observe el cultivo todos los días y registre el progreso, la proliferación de las células y la formación de colonias de células mesenquimales. Usualmente de 10 a 15 días se requieren para obtener del 80 al 90 % de confluencia.

Nota: Posterior al primer cambio de medio, este se debe renovar cada 2 o 3 días.

6.7 Tinción de las células

6.7.1 Cultive las células mesenquimales en láminas de cultivo de 8 pozos con medio de cultivo hasta que alcancen un 80-90% de confluencia.

6.7.2 Aspire el medio cuidadosamente y agregue solución fijadora.

6.7.3 Incube de 5 a 10 minutos a 37°C . Una sobrefijación puede ocasionar malos resultados en la tinción celular.

6.7.4 Aspire la solución fijadora y lave las células 3 veces de 5 a 10 minutos cada una con PBS 1X.

6.7.5 Agregue la solución de bloqueo e incube a 37°C durante 2 horas, o durante toda la noche a 4°C . Para mejores resultados se recomienda usar solución de bloqueo en las células a las cuales se les va a adicionar los anticuerpos dirigidos contra fibronectina, colágeno e integrina $\beta 1$, y solución de bloqueo no-permeable, para anticuerpos de diferenciación celular (CD45, CD54 y CD14).

6.7.6 Aparte, diluya los anticuerpos primarios en PBS 1X de acuerdo a las relaciones siguientes:

- Anti-integrina $\beta 1$ de conejo: 1/500
- Anti-CD54 de rata: 1/100

- Anti-colágeno tipo 1 de conejo: 1/500
 - Anti-fibronectina de rata: 1/100
 - Anti CD14 de ratón: 1/100
 - Anti CD45 de ratón: 1/100
- 6.7.7 Aspire la solución de bloqueo cuidadosamente y adicione a las células los anticuerpos primarios diluidos (uno diferente por cada pozo).
- 6.7.8 En un pozo aparte, dependiendo del anticuerpo específico usado, agregue a las células concentraciones iguales de IgG de ratón (1 mg/mL), y de IgG de conejo (1 mg/mL) diluidas en 0.5 mL de PBS 1X.
- 6.7.9 Incube las células durante la noche a 4°C. No debe sacudir las células en ningún momento pues pueden desprenderse después de largos periodos de incubación.
- 6.7.10 Posterior a la incubación, lave las células 4 veces de 5 a 10 minutos cada una, con PBS 1X, agregando 0,5ml a cada pozo.
- 6.7.11 Bloquee las células con la solución de bloqueo no permeable durante 15 o 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6.7.12 Diluya los anticuerpos secundarios a concentraciones de 1:250 o 1:500 en PBS 1X. Mantenga las diluciones en la oscuridad.
- 6.7.13 Cubra las células con el anticuerpo secundario adecuado (según el anticuerpo primario usado), e incube de 1 a 2 horas a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad.
- 6.7.14 Terminado el tiempo de incubación, lave las células 3 o 5 veces entre 5 y 10 minutos cada una, con PBS 1x (0.5ml por pozo). Mantenga todo el tiempo la lámina de cultivo protegida de la luz, para evitar que se desvanezca el marcaje fluorescente.
- 6.7.15 Tiña el núcleo de las células con la solución para tinción DAPI. Agregue dicha solución a las células y déjela actuar de 2 a 5 minutos. Lave con PVS 1X para remover excesos.
- 6.7.16 Monte un cubreobjetos de vidrio sobre la lámina de cultivo usando la anti-fading mounting solution de "Milipore™"
- 6.8 Visualización de las células
- 6.8.1 Lleve la lámina de cultivo al equipo de microscopía confocal para visualizar la tinción realizada, y los resultados obtenidos.

Nota: Los resultados esperados para la caracterización son: positivo para integrina $\beta 1$, CD54, fibronectina y colágeno tipo1, y negativo para CD45 y CD14. De ser así se tienen realmente células madre mesenquimales.

6.9 Documentación

6.9.1 Lleve una bitácora del proceso donde registre la evolución de los cultivos o si estos fallan en cualquier punto (i.e, por contaminación, pobre crecimiento y/o morfología o insuficiente número de células para criopreservación). Igualmente registre también el proceso de caracterización, los anticuerpos usados en cada pozo y el resultado de la visualización de la tinción.

Referencias:

MILIPORE™. Staining Protocol (for 8-well chamber slides). En: Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Rat), Catalog No. SCR018. USA. 1 folleto.

Anexo B. Protocolo para la inducción y caracterización de cardiomiocitos a partir de células mesenquimales de médula ósea.

Propósito

Este documento describe el procedimiento para la obtención de cardiomiocitos en cultivos *in vitro* a partir de células madre mesenquimales de médula ósea, y su posterior caracterización usando técnicas de inmunocitoquímica.

Tabla de Contenido

- 1.0 Medidas de Seguridad
- 2.0 Equipos Necesarios
- 3.0 Materiales Necesarios
- 4.0 Reactivos y Medios de cultivo
- 5.0 Soluciones de Trabajo
- 6.0 Procedimiento

1.0 Medidas de Seguridad

Nivel de Bioseguridad para el procedimiento es 2, se debe de seguir el procedimiento para el manejo de tejidos primarios. Mantener durante todo el proceso una buena técnica de aepsia.

2.0 Equipo Necesario

- 2.1 Cabina de flujo laminar
- 2.2 Centrifuga refrigerada
- 2.3 Incubadora mantenida a 37 °C, con 5% de CO₂ y atmósfera humidificada
- 2.4 Pipeteador automático
- 2.5 Cámara de Neubauer
- 2.6 Microscopio de contraste de fase
- 2.7 Pipetas automáticas P-10, P-100, P-1000
- 2.8 Micropipetas multicanal
- 2.9 Computador
- 2.10 Congelador a -80 °C
- 2.11 Tanques con nitrógeno líquido
- 2.12 Equipo de microscopía confocal

3.0 Materiales Necesarios

- 3.13 Botellas para cultivos celulares T-25 y T-75 “Falcon” o equivalentes
- 3.14 Tubos para centrifuga estéril de 15 mL y 50 mL “Falcon” o equivalentes
- 3.15 Pipetas estériles de 2, 5, 10 y 25 mL “Falcon” o equivalentes.
- 3.16 Crioviales de 1.8 mL
- 3.17 Hojas de bisturí

4.0 Reactivos y Medios de Cultivo

- 4.18 Solución salina balanceada de Hank’s (HBBS) “Gibco BRL” o equivalentes
- 4.19 Buffer salino fosfato 1X (PBS 1X) pH 7.4 “Gibco BRL” o equivalentes
- 4.20 Dimetilsulfoxido (DMSO) “Sigma” o equivalentes
- 4.21 Colagenasa tipo 1
- 4.22 Tripsina 0.025
- 4.23 Ácido etilendiaminotetra acético disódico (EDTA) 0.5 M pH 7.3 en agua destilada y tamponado con NaOH 10 N. Esterilizado por filtración. “Sigma” o equivalentes.
- 4.24 Azul de tripam al 1% en PBS “Sigma” o equivalentes
- 4.25 L-Glutamina “Gibco BRL” o equivalentes
- 4.26 Piruvato sódico “Gibco BRL” o equivalentes
- 4.27 Aminoácidos no esenciales
- 4.28 Kit de caracterización de cardiomiocitos “Milipore™”
- 4.29 Medio de diferenciación de cardiomiocitos “Milipore™”
- 4.30 Medio de mantenimiento de células stem cardiacas “Milipore™”
- 4.31 Anti-fading mounting solution “Milipore™” o equivalentes

5.0 Soluciones de Trabajo

- 5.1 *Solución de lavado:*
500 mL de HBSS o PBS con 5 mL de Penicilina/Streptomicina. Mantener la solución a 4 °C.
- 5.2 *Reactivos para tripsinización:*
Tripsina/EDTA (SIGMA T-4799, E-6635) (0.025%) Mantener la solución a 20°C.
- 5.3 *Medio para Criopreservación:*
DMEN con 10% de DMSO (SIGMA D-2650) con 10% FBS
- 5.4 *Solución para conteo celular:*
Azul tripan (SIGMA T-6146) al 0.4%
- 5.5 *Solución de Fijado:*
Paraformaldehído al 4% en PBS 1X.

- 5.6 *Solución de Bloqueo:*
PBS 1X complementado con suero de burro al 5% y 0.3% de Triton X-100. Filtrada a través de un filtro de 0.45µm.
- 5.7 *Solución para tinción DAPI:*
200ng/mL de DAPI disueltos en PBS 1X. Mantener la solución en condiciones de oscuridad.

6.0 Procedimiento

6.1 Inducción de cardiomiocitos

- 6.1.1 Transfiera las células madre mesenquimales a botellas de cultivo T-25 o T-75, de acuerdo al volumen de células que se desean diferenciar.
- 6.1.2 Agregue 15 mL o 5 mL (para T-75 y T-25 respectivamente), de medio de diferenciación de cardiomiocitos a las botellas, precalentado a 37°C.
- 6.1.3 Lleve las botellas de cultivo a incubación a 37°C.
- 6.1.4 Filtre la suspensión de médula ósea en un tubo para centrifuga de 50 mL usando un filtro de 70µm.

6.2 Posterior al Cultivo Primario

- 6.2.1 El primer cambio de medio es requerido 24 horas después. Retire el medio de las botellas de cultivo vaciándolo cuidadosamente por el lado donde se encuentran las células.
- 6.2.2 Agregue 15 mL o 5 mL de medio de diferenciación nuevo con una pipeta por el lado contrario a donde se encuentran prendidas las células.
- 6.2.3 Lleve a incubadora de 37°C.
- 6.2.4 Observe el cultivo todos los días y registre el progreso, la proliferación de las células y la formación de colonias de células mesenquimales. Usualmente de 10 a 15 días se requieren para obtener del 80 al 90 % de confluencia.

Nota: Posterior al primer cambio de medio, este se debe renovar cada 2 o 3 días.

6.3 Criopreservación

- 6.3.1 Prepare el medio para criopreservación y marque los crioviales.
- 6.3.2 El día de la criopreservación, lave la monocapa celular con solución de Buffer Fosfato Salino PBS dos veces x 5 minutos, adicione a cada botella de cultivo aproximadamente 2 mL de la solución de tripsina/EDTA al 0.25%, incube por 5 minutos a 37°C.
- 6.3.3 Al terminar el tiempo de incubación observe las botellas al microscopio para verificar el desprendimiento de las células, con

una pipeta serológica de 5 mL. agite las células suavemente, adicione 5 mL. de medio de mantenimiento de células stem cardiacas "Milipore™" y transfiera las células junto con el medio a un tubo cónico de centrifuga de 10 mL. Centrifugue a baja velocidad 900 rpm por 5 minutos,

- 6.3.4 Resuspenda el pelett de células en 2 mL. de medio de mantenimiento. Agregue medio de mantenimiento hasta completar 10 mL.
- 6.3.5 Remueva una alícuota de 0.1 mL. en dos nuevos tubos de 15 mL. que contengan 0.9 mL de Azul de Tripam al 0.4%. Retorne el resto de células a la incubadora hasta la lectura para la congelación.
- 6.3.6 Cuando termine la centrifugación aspire cuidadosamente el medio y resuspenda el pellet
- 6.3.7 Remueva 10 µl de la suspensión del punto 6.5.6 y ejecute el conteo de células y la estimación de la viabilidad.
- 6.3.8 Las células deberán observarse como esferas y aparecen completamente sueltas.
- 6.3.9 Cuento las células. Calcule el número total de células para congelación (i.e. promedio de células contadas x factor de dilución (1:10) x 10000 x volumen de medio (10)). Promedie el resultado de las dos alicuotas. Resuspenda las células en un volumen apropiado de medio de criopreservación, que de una concentración final de 2.8 millones de células por mL
- 6.3.10 Alicuote las células en los crioviales marcados; dispense 1 mL. por vial con pipeta de 5 mL. Poner especial atención de mezclar la suspensión de células durante la alicuota.
- 6.3.11 Criopreserve todos los viales por 24 horas a -70 °C y posteriormente transfiera los viales a Nitrógeno líquido -196 °C.
- 6.3.12 Lleve los frascos a una incubadora a 37 °C con 5% de CO₂

6.4 Tinción de las células

- 6.4.1 Cultive las células mesenquimales en láminas de cultivo de 8 pozos con medio de cultivo hasta que alcancen un 80-90% de confluencia.
- 6.4.2 Aspire el medio cuidadosamente y agregue solución fijadora.
- 6.4.3 Incube de 15 a 20 minutos a 37°C. Aspire la solución fijadora y lave las células 3 veces de 5 a 10 minutos cada una con PBS 1X.
- 6.4.4 Agregue la solución de bloqueo e incube a 37°C durante 2 horas, o durante toda la noche a 4°C.
- 6.4.5 Aparte, diluya los anticuerpos primarios en la solución de bloqueo de acuerdo a las relaciones siguientes:
 - Anti-tropomiosina de oveja: 1/500
 - Anti-troponina I de ratón: 1/100

- Anti-actina de ratón: 1/200
 - Anti-ANP de conejo: 1/200
 - Anti-Desmina de ratón: 1/100
- 6.4.6 Para un control de tinción negativo, en un pozo aparte, agregue a las células concentraciones iguales de IgG de control diluidas en 0.5 mL de solución de bloqueo.
- 6.4.7 Incube las células durante la noche a 4°C. No debe sacudir las células en ningún momento pues pueden desprenderse después de largos periodos de incubación.
- 6.4.8 Posterior a la incubación, lave las células 2 veces de 5 a 10 minutos cada una, con PBS 1X, agregando 0,5 mL a cada pozo. Lave dos veces adicionales con solución de bloqueo durante el mismo tiempo.
- 6.4.9 Al terminar el último lavado, deje las células con la solución de bloqueo durante mínimo 30 minutos.
- 6.4.10 Diluya los anticuerpos secundarios a concentraciones de 1:250 o 1:500 en solución de bloqueo. Normalmente se usa anti-ratón IgG Cy3, anti-conejo IgG Cy3 y anti-oveja IgG Cy3, todos derivados de burro. Mantenga las diluciones en la oscuridad.
- 6.4.11 Cubra las células con el anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia adecuado (según el anticuerpo primario usado), e incube por 2 horas a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad.
- 6.4.12 Terminado el tiempo de incubación, lave las células 3 o 5 veces entre 5 y 10 minutos cada una, con PBS 1x (0.5 mL por pozo). Mantenga todo el tiempo la lámina de cultivo protegida de la luz, para evitar que se desvanezca el marcaje fluorescente.
- 6.4.13 Tiña el núcleo de las células con la solución para tinción DAPI. Agregue dicha solución a las células y déjela actuar de 2 a 5 minutos. Lave con PVS 1X para remover excesos.
- 6.4.14 Monte un cubreobjetos de vidrio sobre la lámina de cultivo usando la anti-fading mounting solution "Milipore™".

6.5 Visualización de las células

- 6.5.1 Lleve la lámina de cultivo al equipo de microscopía confocal para visualizar la tinción realizada, y los resultados obtenidos.

Nota: Los resultados esperados para la caracterización son positivos para integrina los anticuerpos primarios usados (anti-desmina, anti- α actina, anti-troponina I, anti-desmina y anti-ANP)

6.6 Documentación

- 6.6.1 Lleve una bitácora del proceso donde registre la evolución de los cultivos o si estos fallan en cualquier punto (i.e, por contaminación, pobre crecimiento y/o morfología o insuficiente número de células para criopreservación). Igualmente registre también el proceso de caracterización, los anticuerpos usados en cada pozo y el resultado de la visualización de la tinción.

Referencias:

MILIPORE™. Cell Culture Protocol. En: Cardiomyocyte Differentiation Medium, Catalog No. SCM102. USA. 1 folleto.

MILIPORE™. Staining Protocol (for 8-well chamber slides). En: Cardiomyocyte Characterization Kit (Rat), Catalog No. SCR059. USA. 1 folleto.